



TITLE:

酸化カルシウムと二酸化ケイ素を
主成分とする無機固体物質の生体
活性(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

大槻, 主税

CITATION:

大槻, 主税. 酸化カルシウムと二酸化ケイ素を主成分とする無機固体物質の生体活性. 京都大学, 1992, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1992-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3088559>

RIGHT:

新 制
理
767

京大附図

学 位 申 請 論 文

大 槻 主 税

酸化カルシウムと二酸化ケイ素を主成分
とする無機固体物質の生体活性

Bioactivity of inorganic solid substance based on calcium oxide and
silicon dioxide

大槻主税

目次

緒言	1
----	---

第1章 体内におけるセラピタル型結晶化ガラス表面でのアパタイト生成

1. 緒言	7
2. 実験方法	8
2.1. 試料の調製	8
2.2. 擬似体液への浸漬	8
2.3. 骨への埋入	9
2.4. 表面構造の分析	9
2.5. 界面構造の分析	9
3. 結果と考察	10
4. 総括	12
文献	13
図表	15

第2章 CaO-SiO₂-P₂O₅系ガラスの生体活性の組成依存性： *in vitro* 評価

1. 緒言	20
2. 実験方法	22
2.1. ガラスの調製	22
2.2. 擬似体液への浸漬	22
2.3. 表面構造の分析	22
3. 結果	24
4. 考察	26

5. 総括	28
文献	29
図表	32

第3章 CaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラスの生体活性の組成依存性：*in vitro* 評価

1. 緒言	44
2. 実験方法	46
2.1. ガラスの調製	46
2.2. 擬似体液への浸漬	46
2.3. 表面構造の分析	46
3. 結果と考察	48
4. 総括	51
文献	52
図表	55

第4章 擬似体液中におけるCaO-SiO₂-P₂O₅系ガラス表面でのアパタイト層生成機構

1. 緒言	68
2. 実験方法	70
2.1. ガラスの調製	70
2.2. 擬似体液への浸漬	70
2.3. 表面構造の分析	71
2.4. 元素濃度の測定	71
3. 結果	72
3.1. 表面構造変化	72

3.2.元素濃度変化	7 3
4. 考察	7 4
5. 総括	7 9
文献	8 0
図表	8 4
総括	9 6
謝辞	1 0 0

緒 言

一般に、人工材料を骨の欠損部に埋入すると、生体はこれを線維性の被膜によって取り囲み、周囲の骨から隔離しようとする。これは、生体が示すごく自然な防御反応の一つである。しかし、無機固体物質の中には少数ながら、周囲に線維性被膜を全く作らずに、周囲の生きている骨と直接接し、それと強く結合するものがある。それらは生体活性物質と呼ばれる。

生体活性物質の中、最初に見い出されたものは、1972年にHenchら¹⁾によって発見された。 $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ 系のガラスであり、Bioglassと呼ばれている。その代表的な組成は Na_2O 24.5、 CaO 24.5、 SiO_2 45、 P_2O_5 6 wt%であり、この組成のガラスは、骨だけでなく軟組織とも結合する。

次いで、1973年にBrömerら²⁾は、ガラス中にアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{O}, \text{F}_2)$) を析出させた $\text{Na}_2\text{O}-\text{K}_2\text{O}-\text{MgO}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ 系の結晶化ガラスも生体活性を示すことを明らかにし、Ceravitalと名付けた。さらに、1977年にはJarchoら³⁾が結晶性の水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) 焼結体も同様に生体活性を示すことを明らかにし、同じ年Rejdaら⁴⁾が結晶性の β - $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ 焼結体も生体活性を示すと報告した。その後、Kokuboら⁵⁾は1982年にガラス中に酸素-フッ素アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{O}, \text{F}_2)$) と β -ウオラストナイト ($\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$) を析出させた $\text{MgO}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{CaF}_2$ 系の結晶化ガラスA-Wが生体活性を示すことを明らかにし、Bergerら⁶⁾も、Kokuboらとは独立にA-Wとやや異なる組成のアパタイトとウオラストナイトを析出した結晶化ガラスが、生体活性を示すことを報告した。1983年にはHollandら⁷⁾が、アパタイトと金雲母 ($(\text{Na}, \text{K})\text{Mg}_3(\text{AlSiO}_{10})\text{F}_2$) を析出させた $\text{Na}_2\text{O}-\text{K}_2\text{O}-\text{MgO}-\text{CaO}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{F}$ 系の結晶化ガラスBioveritが生体活性を示すことを明らかにし、同じ年Walkerら⁸⁾が結晶性の天然方解石も生体活性を示すと報告した。さらに1991年にはOhuraら⁹⁾が、ガラス中にマグネタイト (Fe_3O_4) と β -ウオラストナイト

を析出した結晶化ガラスも生体活性を示すことを明らかにした。

このように、Bioglassの発見以来、種々の組成と構造を有する無機固体物質が生体活性を示すことが明らかにされてきたが、これらの物質は無機固体物質の中のごく一部であり、大部分の無機固体物質は生体活性を示さない。何故特定の物質が生体活性を示し、他の物質が示さないかを明らかにすることは、生体活性物質の設計指針を得るためにも、また自然の骨の生体内における石灰化機構を知る上でも重要である。本研究は、これらの点を特に酸化カルシウムと二酸化ケイ素を主成分とする物質について基礎的に明らかとすることを目的とする。

生体活性な無機固体物質と骨の結合界面の構造については、先ずHenchら^{10・11)}が、Bioglassと骨の結合界面には、Bioglassに近い部分にシリカゲル層が、骨に近い部分にカルシウムとリンに富む層が存在し、両者はこれらの層を介して結合していることを明らかにした。さらに、彼らはこの2つの層がpH7.4のトリス緩衝溶液中においてもBioglass表面に生成することを示し、X線回折によればカルシウムとリンに富む層は水酸アパタイトであると報告した。次いで、Kitsugiら^{12・13)}は、結晶化ガラスA-Wと骨の界面にはシリカゲル層が存在せず、カルシウムとリンに富む層だけが存在することを示し、Kokuboら¹⁴⁾は微小部X線回折により、そのカルシウムとリンに富む層が結晶性のアパタイトから成ることを明らかにした。さらに、Kokuboら^{15・16)}は同結晶化ガラスをヒトの体液に等しいイオン濃度を有する水溶液に浸漬すると、その表面にアパタイト層が形成されることを示し、同アパタイト層は、骨の無機質と同種の炭酸イオン含有水酸アパタイトの微粒子の集合体であることを明らかにした。Hollandら¹⁷⁾は、結晶化ガラスBioveritと骨の界面にもカルシウムとリンに富む層が存在することを報告している。

これらの結果は、いずれも少なくとも酸化カルシウムと二酸化ケイ素を含む無機質ガラス及び結晶化ガラスに関する限り、これらの物質が生体活性を示す条件は、生体内でその表面に骨類似のアパタイト層を形成することであることを示し

ているように見える。このようなアパタイト層が形成されるとその表面では線維性の被膜を作る線維芽細胞より骨を作る骨芽細胞の方が増殖し易く、その結果その表面には線維性被膜が形成されず、骨は表面のアパタイト層と直接接することができる。両者が接すると両者は同種のアパタイトであるので、その間の界面エネルギーを下げるために化学結合を生じると考えられる。生体環境下で骨類似のアパタイトとアパタイトの間に強い化学結合が生じ得ることは、結晶化ガラスA-Wの角柱状試料を2本合わせて擬似体液に浸漬すると、両者がその表面に形成される骨類似のアパタイト層によって、互いに強く結合することから確かめられる^{18, 19)}。ただし、これまでに見い出された生体活性な無機質ガラス及び結晶化ガラスの中、Ceravital型の結晶化ガラスと骨の界面については、アパタイト層の形成が報告されておらず、Grossら^{20, 21)}により別の結合機構が提案されている。すなわち、結晶化ガラスは体内で、アパタイト相を溶出し、次いで残ったガラス相がマクロファージにより貪食され、その後に結晶化ガラス表面にグランドサブスタンスが形成され、これにより結晶化ガラスは骨と結合する。

そこで、著者らは先ず本研究においてCeravital型の結晶化ガラスが生体内でその表面にアパタイト層を作らず別の機構により骨と結合するか否かを*in vitro*と*in vivo*の実験により検討した。その結果、Ceravital型の結晶化ガラスもまた、生体内でその表面に骨類似のアパタイト層を作って、それを介して骨と結合することが確かめられた。これらの結果に基づけば、少なくとも酸化カルシウムと二酸化ケイ素を含む無機質ガラス及び結晶化ガラスに関する限り、人工材料が生体内で生きている骨と自然に結合するための条件は、その材料が生体内でその表面に骨類似のアパタイト層を形成することであると言える。

それではどんな物質が生体内でその表面に骨類似のアパタイト層を作るのであろうか。Kokuboら²²⁾によれば、結晶化ガラスA-Wの組成に少量の Al_2O_3 を添加すると、生体内で結晶化ガラス表面にアパタイト層が形成されなくなり、結晶化ガラ

スは骨と結合しなくなる。この原因は、結晶化ガラスA-Wの場合にはガラス相とウオラストナイト相からカルシウムとケイ酸イオンが溶出し、この中カルシウムイオンが周囲の体液の過飽和度を高め、ケイ酸イオンが結晶化ガラス表面にアパタイトの核形成を誘導する構造を作るため、その表面にアパタイト層が形成されるが、 Al_2O_3 を含む結晶化ガラスの場合には、カルシウムとケイ酸イオンの溶出が、ガラス相中の Al_2O_3 により抑制されるため、その表面にアパタイト層の形成が抑制されるのではないかと説明される。しかし、結晶化ガラスA-Wはアパタイト、ウオラストナイト、ガラス相の3相から成り、組成も複雑であるのでその体液との反応機構も複雑である。生体内における無機固体物質表面でのアパタイト生成の機構を基礎的に明らかにするためには、1相でしかも組成が単純で連続的に変化できるものを研究対象とするのが好ましい。この目的のためには、これまでに生体活性を示すことが明らかにされている無機質ガラス及び結晶化ガラスに共通する CaO 、 SiO_2 、 P_2O_5 の3つの成分からなるガラスを選ぶのが適当であると考えられる。そこで先ずこの三成分系において擬似体液中で、ガラスがその表面にアパタイト層を形成する組成域を調べた。次いで生体活性性を抑制する成分の代表として Al_2O_3 を選び、これを CaO と SiO_2 を組み合わせた単純な三成分系についてもガラスが擬似体液中でその表面にアパタイト層を形成する組成域を調べた。

これらの結果に基づいて、表面アパタイトの形成が特定の組成に限られる原因を特に $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 系について追究した。すなわち、同系ガラスを擬似体液に浸漬したときのガラス表面の構造変化と、擬似体液のイオン濃度変化を同時に時間を追って追跡し、その結果に基づき、ガラス表面におけるアパタイトの核形成速度をできる限り定量的に評価し、それにより生体内における酸化カルシウムと二酸化ケイ素を主成分とする物質の表面アパタイトの形成を支配する因子を基礎的に明らかにしようとした。

参考文献

- 1) L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen and T. K. Greenlee, J. Biomed. Mater. Res. Symp., 2 (1972) p. 117
- 2) H. Brömer, E. Pfeil and H. H. Kos, German Patent No. 2,326,100 (1973).
- 3) M. Jarcho, J. F. Kay, K. I. Gumaer, R. H. Doremus and H. P. Drobeck, J. Bioeng., 1, (1977) 79.
- 4) B. V. Rejda, J. G. J. Peelen and K. de Groot, J. Bioeng., 1 (1977) 93.
- 5) T. Kokubo, M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro and S. Higashi, Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ, 60, (1982) 260.
- 6) G. Berger, R. Sauer, G. Steinborn, F. G. Wihsmann, V. Thieme, St. Kohler and H. Dressel, "Proceedings of XV Internl. Congress on Glass", Vol. 3a, ed. by O. V. Mazurin (Nauka, Leningrad, 1989) p. 120.
- 7) W. Hölzland, K. Naumann, W. Vogel and J. Gummel, Wiss. Z. Freidrich-Schiller-Univ Jena, math.-nat. Reihe, 32 (1983) 571.
- 8) M. M. Walker and J. L. Katz, Bull. Hospital for Joint Diseases Orthopaedic Inst., XLIII (1983) 103.
- 9) K. Ohura, M. Ikenaga, T. Nakamura, T. Yamamuro, Y. Ebisawa, T. Kokubo, Y. Kotoura and M. Oka, J. Appl. Biomater, 2 (1991) 153.
- 10) L. L. Hench, "Fundamental Aspects of Biocompatibility", Vol. 1, Ed. by D. F. Williams (CRC Press, Boca Raton, 1981) p. 67
- 11) L. L. Hench and A. E. Clark, "Biocompatibility of Orthopaedic Implants", Vol. 2, Ed. by D. F. Williams (CRC Press, Boca Raton, 1982) p. 129.

- 12) T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura, S. Higashi, Y. Kakutani, K. Hyakuna, S. Ito, T. Kokubo, M. Takagi, and T. Shibuya, J. Biomed. Mater. Res., 20 (1986) 1295.
- 13) T. Kitsugi, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, T. Shibuya, and M. Takagi, J. Biomed. Mater. Res., 21 (1987) 1255.
- 14) T. Kokubo, C. Ohtsuki, S. Kotani, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, "Bioceramics", Vol. 2, edited by G. Heimke, (German Ceramic Society, Cologne, 1990) p.113.
- 15) T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, J. Biomed. Mater. Res., 24 (1990) 331.
- 16) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, J. Biomed. Mater. Res., 24 (1990) 721.
- 17) W. Höland, W. Vogel, K. Naumann and J. Gummel, J. Biomed. Mater. Res., 19 (1985) 303.
- 18) T. Kokubo, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, Yogyo-Kyokai-Shi, 95 (1987) 785.
- 19) T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura, T. Kokubo, M. Takagi, T. Shibuya, H. Takeuchi, and M. Ono, J. Biomed. Mater. Res., 21 (1987) 1109.
- 20) U. Gross, J. Braudes, V. Strunz, I. Bab, and J. Sela, J. Biomed. Mater. Res., 15 (1981) 291.
- 21) U. Gross, and V. Strunz, J. Biomed. Mater. Res., 19, 251-271 (1985)
- 22) T. Kokubo, J. Non-Cryst. Solids, 120 (1990) 138.

生体内におけるセラビタル型結晶化ガラス表面でのアパタイト生成

1. 緒言

Kokuboらは、先に結晶化ガラスA-Wやその一連の物質に関する研究で、体内で骨と結合する性質、即ち生体活性を示す無機質ガラス及び結晶化ガラスは、生体内でその表面にアパタイト層を形成するが、生体活性を示さないガラスや結晶化ガラスは同層を形成しないことを示した¹⁻⁸⁾。同様の表面アパタイト層の形成と生体活性の関係は、Bioglass型のガラスについても報告されている^{9,10)}。これらの知見は、無機質ガラス及び結晶化ガラスが骨と結合するための必須条件は、生体内でそれら表面にアパタイト層を形成することであることを示している。

一方、Grossらはアパタイトのみを析出させたCeravital型の結晶化ガラスと骨の結合機構について、表面アパタイト層の形成を言及せずに説明している^{11,12)}。即ち、先ず結晶化ガラスからアパタイトが溶け、残ったガラス相がマクロファージにより貪食され、その後グランドサブスタンスが現れ、結晶化ガラスは骨と結合すると述べている。

本研究では、Ceravital型の結晶化ガラスの表面でのアパタイト形成を*in vitro* 及び*in vivo* で調べた。

2 実験方法

2.1. 試料の調製

Grossら¹¹⁾によりKGSと名付けられたアパタイト含有結晶化ガラスを以下の手順にて調製した。化学試薬の Na_2CO_3 、 CaCO_3 、 SiO_2 及び $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を Na_2O 5、 CaO 33、 SiO_2 46、 $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ 16 wt%になるように混合し、その原料粉末50gを50mlの白金るつぼに入れ、 MoSi_2 炉中にて 1480°C で2時間溶融し、融液を室温の鉄板上に流し出し、上から別の鉄板で押さえて厚さ約1mmの板状ガラスとした。このガラスを SiC 炉中にて室温から 750°C まで $5^\circ\text{C}/\text{min.}$ の速度で昇温し、 750°C で10時間保持した後、さらに 830°C まで $5^\circ\text{C}/\text{min.}$ の速度で昇温し、 830°C で2時間保持し、その後炉冷することにより結晶化させた。粉末X線回折の結果、同加熱処理試料中に析出している結晶はアパタイトのみであることが確認された。

2.2. 擬似体液への浸漬

得られた結晶化ガラスから $15 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$ の大きさの板状試料を切り出し、その表面を $3 \sim 4 \mu\text{m}$ のダイヤモンドペーストで研磨し、アセトン及びイオン交換水でこの順に洗浄した後、表1に示す細胞を含まず無機イオン濃度をヒトの血漿成分のそれにほぼ等しくした擬似体液35mlに浸漬した¹³⁾。擬似体液は、イオン交換水に化学試薬の NaCl 、 NaHCO_3 、 KCl 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 及び Na_2SO_4 を溶かし、緩衝剤としてトリスヒドロキシメチルアミノメタン($(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$) 50mMと塩酸(HCl) 45mMを加えて、pHを7.25に保ち、その温度を 36.5°C に保った。この擬似体液を用いれば生体内における生体活性結晶化ガラスA-Wの表面構造変化、即ち表面でのアパタイト層の形成を再現できることがすでに確かめられている¹⁴⁾。種々の期間浸漬後、液から試料を取り出し、アセトンで軽く洗浄した。

2.3. 骨への埋入

同結晶化ガラスの $15 \times 10 \times 2 \text{ mm}^3$ の板状試料を#2000のアルミナ粉で研磨し、超音波洗浄機にてエタノールで洗浄した後、エチレンオキサイドガスで滅菌した。この試料を、以前に報告されている手法によって¹⁵⁾、雄の成熟家兔の脛骨骨幹端に埋入した。

2.4. 表面構造の分析

擬似体液に浸漬された試料の表面を薄膜X線回折、フーリエ変換赤外反射分光法及び走査電子顕微鏡観察により調べた。X線回折には、Rigaku 2651A1薄膜アッタチメントを用い、X線の試料表面への入射角は 1° で行った。赤外分光法には、日本分光FT-IR-5M分光光度計を用い、反射角 75° で行った。両者の手法を用いれば、表面の厚さ約 $1 \mu\text{m}$ の層だけの分析が可能になる。走査電子顕微鏡観察は、試料表面に白金の薄膜をコーティングし、日立S-450型走査電子顕微鏡を用いて行った。

2.5. 界面構造の分析

骨に埋入された試料は、術後2、4、6及び8週後に周囲の骨と共に摘出し、10%リン酸緩衝ホルマリン液で7日間固定化した。その後、70、80、90、100及び100%のエタノール中で、それぞれ3日間ずつ脱水した後、ポリエステル樹脂に包埋した。得られた試料を、結晶化ガラスと骨の界面に垂直に切断し、 $1 \mu\text{m}$ のダイヤモンド紙で研磨し、金の薄膜をコーティングした後電子線プローブX線マイクロアナリシス(EPMA)で調べた。エネルギー分散型X線マイクロアナライザー(堀場 EMAX-2200)を取り付けた走査電子顕微鏡(日立 X-650)を用いた。

.

3. 結果と考察

擬似体液に種々の期間浸漬した結晶化ガラスの表面の薄膜X線回折の結果を図1に示す。Joint Committee on Powder Diffraction Standardsのデータファイルより、図1に見られる回折線は全てアパタイトによるものであると帰属された。図1から、試料が擬似体液に浸漬されると、回折ピークの幅が広くなることが分かる。このことは、結晶化ガラス中に存在するアパタイトとは異なる種類の、結晶子が小さいか、もしくは格子歪の大きいアパタイトの層が、擬似体液中で1日以内に結晶化ガラス表面に新しく形成されたことを示している。

同じ試料表面のフーリエ変換赤外反射スペクトルを図2に示す。図2には、焼結水酸アパタイトとソーダライムガラスの反射スペクトルを参考にして得られた主なピークの帰属も示した。図2から、試料の浸漬に伴い、ガラス相で帰属される反射ピークの強度は減少するが、アパタイトで帰属される反射ピークの強度は増加することが分かる。さらに図2から、試料を擬似体液に浸漬すると 1400 cm^{-1} 付近に CO_3^{2-} イオンで帰属される反射ピークが現れることも分かる。このことは、炭酸イオン含有アパタイトが擬似体液中で1日以内に新たに結晶化ガラス表面に形成されたことを示している。

同じ試料表面の走査電子顕微鏡写真を図3に示す。図3から、1日以内に結晶化ガラス表面に $0.5\sim 1.0\text{ }\mu\text{ m}$ の大きさの多くの鱗片状粒子が観察される。この粒子の形態は、擬似体液中で結晶化ガラスA-W表面に形成されたアパタイトの形態に^{2,5)}よく似ている。結晶化ガラスの表面には部分的に、図3-(f)に示すような菊花状の粒子も観察された。Grossらは先に、同様の菊花状粒子の透過電子顕微鏡写真を報告している¹¹⁾。これらの粒子は、新らしく表面に形成されたアパタイト層の下にある結晶化ガラスの中のアパタイト結晶であると考えられる。従って、それらは表面アパタイト層が剥がれ落ちた部分だけで観察されたと考えられる。上記の結果

から、Ceravital型のアパタイト含有結晶化ガラスの場合にも、擬似体液中でその表面に生体の骨組織のアパタイトに類似した、結晶子が小さいか、もしくは格子歪の大きい炭酸含有水酸アパタイトの薄層が形成されることが明らかである。

家兎脛骨に8週間埋入した結晶化ガラスと骨の界面に垂直な断面のEPMAの結果を図4に示す。図4から、界面にナトリウムとケイ素が少なくカルシウムとリンに富む層が存在することが分かる。この層は、埋入後2週間で約 $2\mu\text{m}$ 、8週後で約 $5\mu\text{m}$ の厚さになる。8週間埋入された結晶化ガラスは、周囲の骨と強固に結合するのが確かめられた。これらの結果は、この結晶化ガラス表面にも体内でカルシウムとリンに富む層が形成し、同層が結晶化ガラスと骨の化学結合の形成に重要な役割を果たしていることを示している。このカルシウムとリンに富む層は擬似体液中で結晶化ガラス表面に形成される骨類似のアパタイト層に相当していると考えられる。

以上の *in vitro* 及び *in vivo* の知見は、Ceravital型の結晶化ガラスも、体内でその表面にアパタイト層を形成し、それを介して骨と結合することを示している。いったん、表面アパタイト層が形成されると、表面アパタイトの組成と構造の特徴は生体の骨組織のアパタイトの特徴に非常によく類似しているので、骨芽細胞はアパタイト層の表面で優先的に増殖する^{9, 10)}。その結果、その周りに線維性のカプセルは作られず、周囲の骨は結晶化ガラスに直接接する。これが起こると、表面アパタイトと骨のアパタイトの間に強い化学結合が起こると考えられる。アパタイト結晶が体内の環境下で互いに強い化学結合を作ることはすでに知られている^{16, 17)}。

4. 総括

生体活性なBioglass型ガラス及びA-W型結晶化ガラスについての*in vivo* 及び*in vitro* での表面構造変化に関する研究で、無機質ガラス及び結晶化ガラスが骨と結合するための必須条件は、生体内でその表面に骨類似のアパタイト層を形成することであると報告されている。しかし、GrossらはCeravital型のアパタイト含有結晶化ガラスと骨の結合機構を、表面のアパタイト層の形成については言及せずに説明している。本研究では、Ceravital型の結晶化ガラス表面におけるアパタイト形成を*in vitro* 及び*in vivo* で調べた。GrossらがKGSとして報告している Na_2O 5、 CaO 33、 SiO_2 46及び $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ 16 wt%組成のアパタイト含有結晶化ガラスを、細胞を含まず無機イオン濃度をヒトの血漿のそれにほぼ等しくした擬似体液に浸漬した。同じ結晶化ガラスを家兎脛骨に埋入した。擬似体液に浸漬した結晶化ガラス表面を薄膜X線回折、フーリエ変換赤外反射分光法及び走査電子顕微鏡観察により調べた結果、Ceravital型の結晶化ガラスも同液中でその表面に結晶子が小さいか格子欠陥の多い炭酸イオン含有水酸アパタイトを形成することが分かった。家兎脛骨に埋入した同結晶化ガラスと周囲の骨の界面を電子線プローブX線マイクロアナリシスにより調べた結果、界面にカルシウムとリンに富む薄層が存在することが分かった。これらの結果は、Ceravital型の結晶化ガラスも生体内で骨類似のアパタイト層を形成し、それを介して骨と結合することを示している。従って、全ての無機質ガラス及び結晶化ガラスが骨と結合するための必須条件は、生体内で表面に骨類似のアパタイト層を形成することであると結論できる。

参考文献

- 1) T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura and T. Kokubo, J Biomed. Mater Res., 23 (1989) 631.
- 2) T. Kokubo, S. Sakka, T Kitsugi, T. Yamamuro, M. Takagi, and T. Shibuya, "Ceramics in Clinical Application", edited by P. Vincenzini, (Elsevier, Amsterdam, 1987) p. 175.
- 3) T. Kitsugi, T Yamamuro, T. Nakamura, S. Higashi, Y Kakutani, K. Hyakuna, S. Ito, T. Kokubo, M. Takagi, and T Shibuya, J. Biomed. Mater Res., 20 (1986) 1295.
- 4) T Kitsugi, T. Nakamura, T Yamamuro, T. Kokubo, T. Shibuya, and M. Takagi, J Biomed. Mater Res., 21 (1987) 1255.
- 5) T Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T Kitsugi, and T Yamamuro, J Biomed. Mater Res., 24 (1990) 331.
- 6) T Kokubo, C. Ohtsuki, S. Kotani, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, "Bioceramics", Vol. 2, edited by G. Heimke (German Ceramic Society. Cologne, 1990) p.113.
- 7) T Nakamura, T. Yamamuro, S. Higashi, Y. Kakutani, T. Kitsugi, T Kokubo, and S. Ito, "Treatise on Biomedical Materials", Vol. 1, edited by T. Yamamuro (Kyoto Univ., Kyoto. 1983) p. 109.
- 8) T. Kitsugi, T Yamamuro, T. Nakamura, and T. Kokubo, International Orthopaedics (SICOT), 13 (1989) 199.
- 9) L. L. Hench, "Fundamental Aspects of Biocompatibility", Vol. 1, edited by D. F. Williams (CRC Press, Boca Raton, 1981) p. 67
- 10) L. L. Hench, and A. E. Clark, "Biocompatibility of Orthopaedic

- Implants", Vol. II, edited by D. F. Williams (CRC Press, Boca Raton, 1982) p. 129
- 11) U. Gross, J Braudes, V Strunz, I Bab, and J Sela, J. Biomed. Mater Res., 15 (1981) 291.
- 12) U. Gross, and V. Strunz, J. Biomed. Mater. Res., 19 (1985) 251.
- 13) J. Gamble, "Chemical Anatomy. Physiology and Pathology of Extracellular Fluid", 6th Ed. (Harvard University Press, Cambridge, 1967) p. 1.
- 14) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T Kitsugi, and T. Yamamuro, J Biomed. Mater Res., 24 (1990) 721.
- 15) T. Nakamura, T. Yamamuro, S. Higashi, T. Kokubo, and S. Itoo, J. Biomed. Mater Res., 19 (1985) 685.
- 16) T. Kokubo, T. Hayashi S. Sakka T Kitsugi, and T. Yamamuro, Yogyo-Kyokai-Shi, 95 (1987) 785.
- 17) T Kitsugi, T Yamamuro, T. Nakamura, T. Kokubo, M. Takagi, T. Shibuya, H. Takeuchi, and M. Ono, J Biomed. Mater Res., 21 (1987) 1109.

表 1. 擬似体液及びヒトの血漿のイオン濃度。

	Ion concentration (mM)						
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻ SO ₄ ²⁻
Simulated fluid	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0 0.5
Blood plasma	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0 0.5

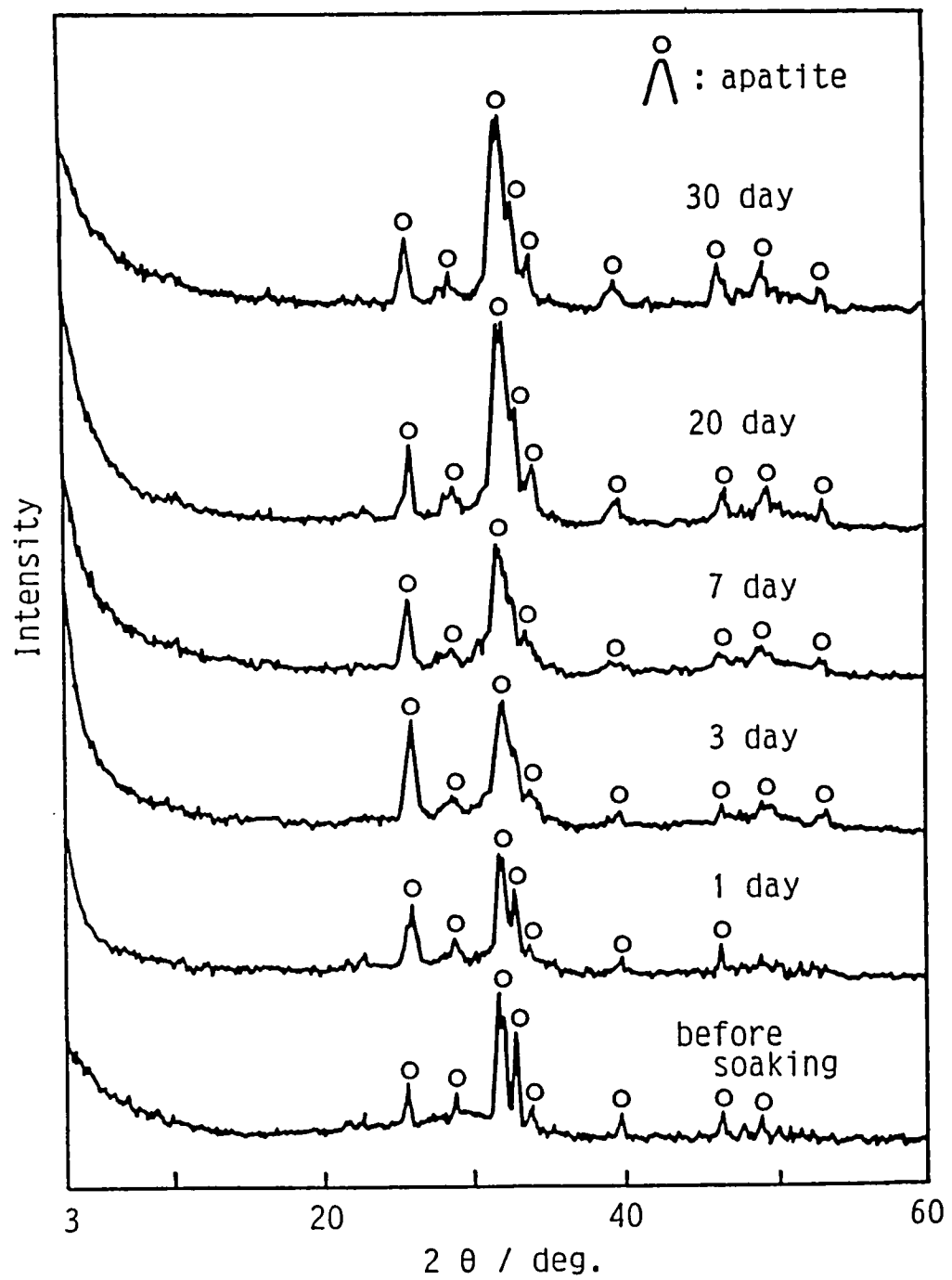


図1 種々の期間擬似体液に浸漬した結晶化ガラス表面の薄膜X線回折図。

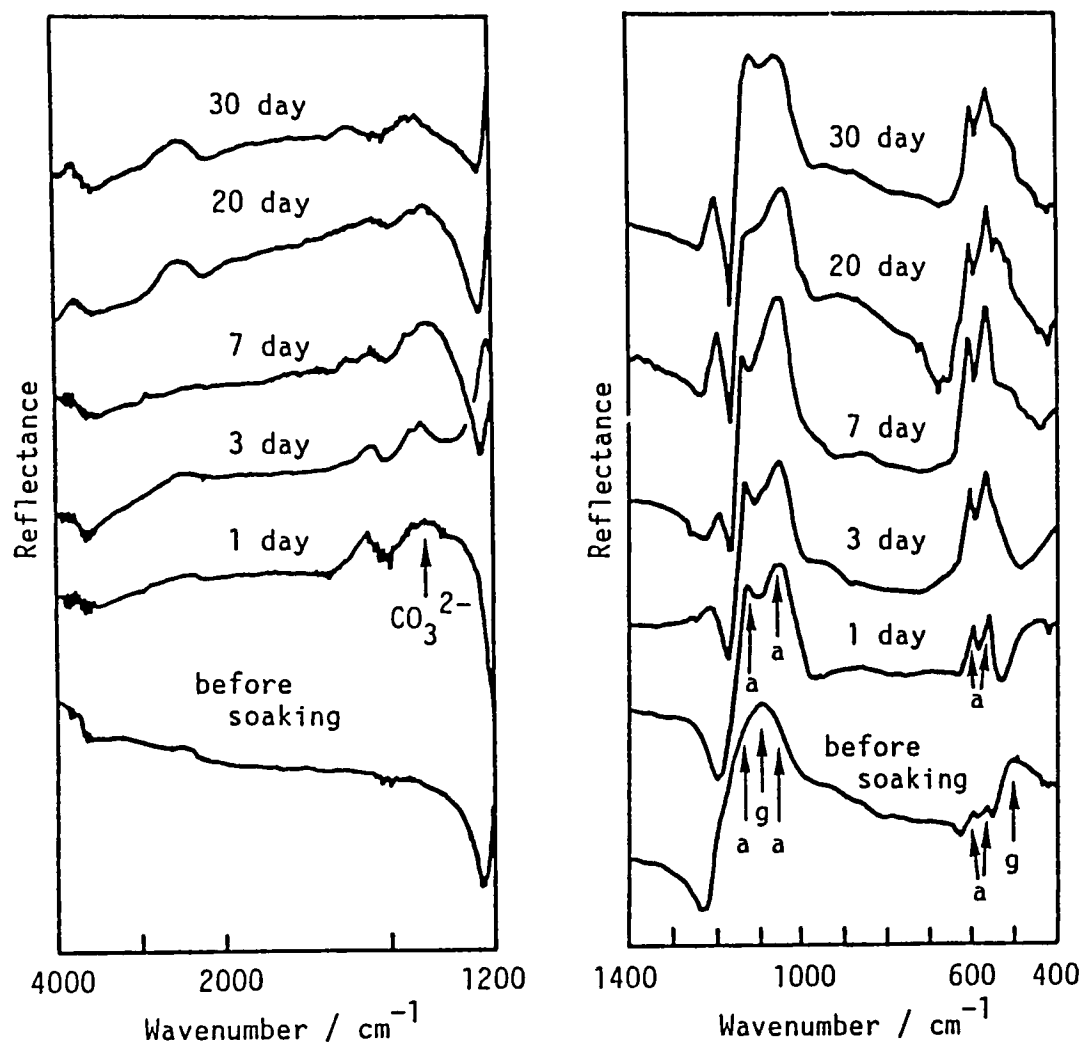


図2 種々の期間擬似体液に浸漬した結晶化ガラス表面のフーリエ変換赤外反射スペクトル。

a: アパタイト, g: ガラス相。

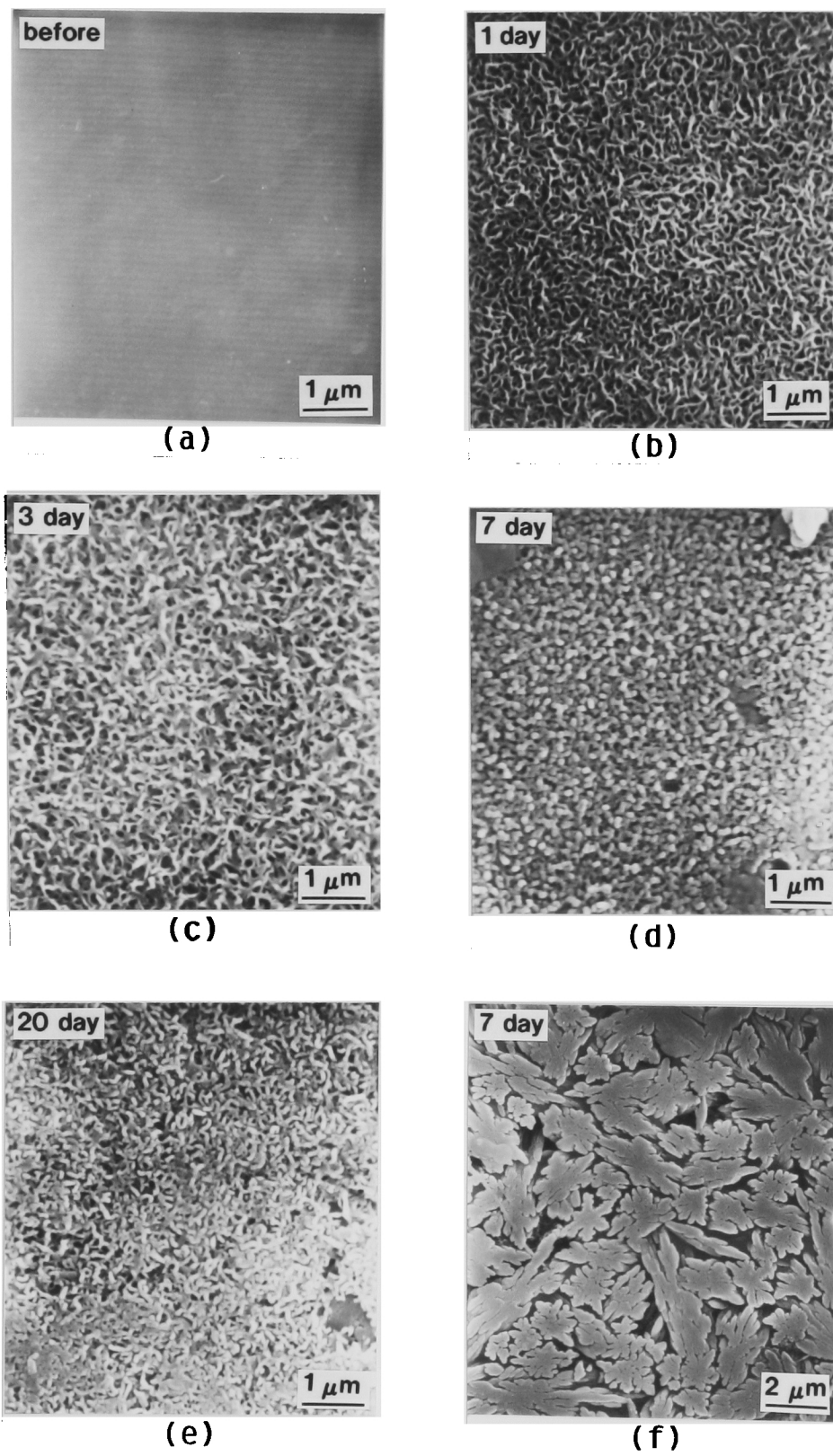


図3 種々の期間擬似体液に浸漬した結晶化ガラス表面の走査電子顕微鏡写真。

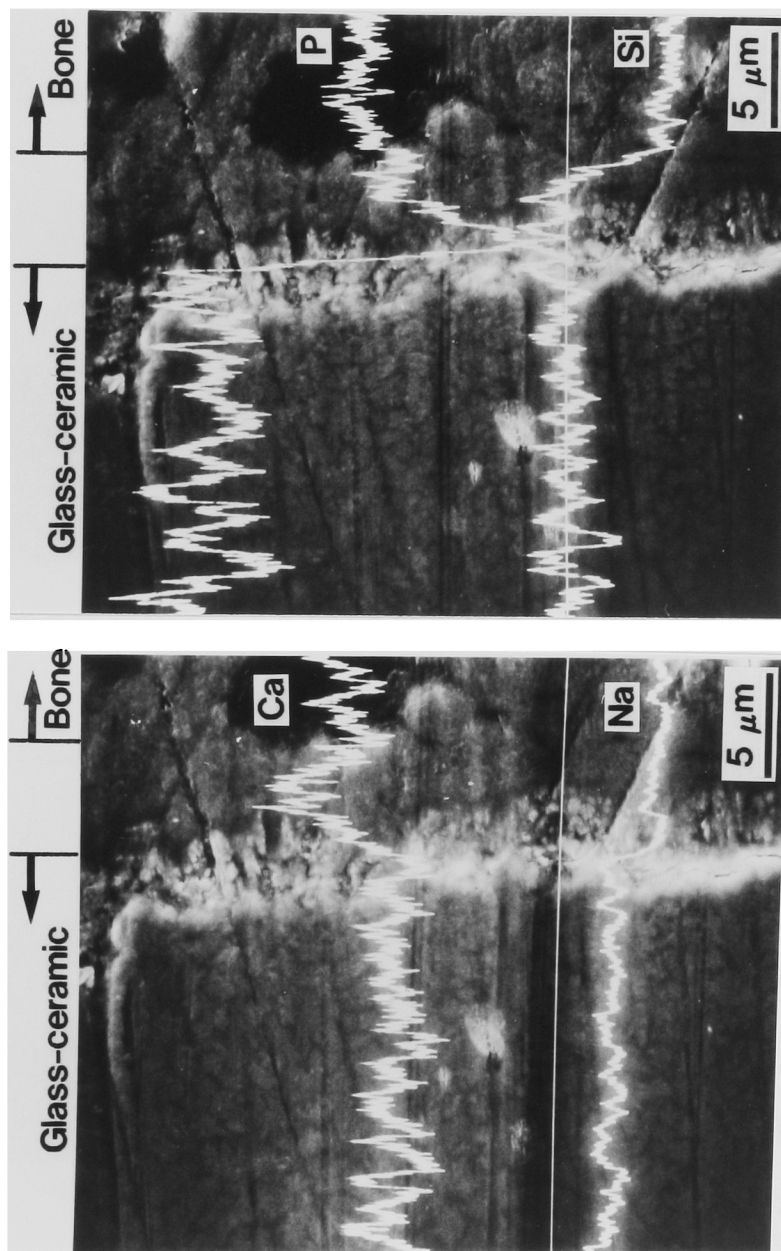


図 4. 家兔脛骨に 8 週間埋入した結晶化ガラスと骨の界面に垂直な断面の電子線プロープ X 線マイクロアナリシスの結果。

第2章

CaO-SiO₂-P₂O₅系ガラスの生体活性の組成依存性： *in vitro* 評価

1 緒言

1972年にHenchらによりBioglassが発見¹⁾されて以来、種々の無機質ガラス及び結晶化ガラスが生体骨と結合することが明らかにされてきた²⁻⁴⁾。それらの生体活性なガラスや結晶化ガラスのうち、Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅系のBioglass⁵⁾、アパタイトを析出させた結晶化ガラスCeravital⁶⁾、アパタイトとウオラストナイトを析出させた結晶化ガラスA-W⁷⁾及びアパタイトと金雲母を析出させた結晶化ガラスBioverit⁸⁾などはすでに人工耳小骨、顎堤維持埋入材、人工椎体、椎間板、人工腸骨及び人工歯根などとして実用化されている。

これら生体活性な無機質ガラス及び結晶化ガラスと骨の結合機構については、Henchら^{8,9)}、Grossら^{11,12)}ら、Kokuboら^{13,14)}及びKarlssonら^{15,16)}らによって研究されてきた。それらの研究により、生体活性な無機質ガラス及び結晶化ガラスは体内で新たに形成されたアパタイトの層を介して骨と結合すること、及び同表面アパタイト層の形成が、ガラス及び結晶化ガラスが骨と結合するための必須条件であることが明らかにされてきた。しかしながら、どのような種類のガラス及び結晶化ガラスが体内で表面アパタイト層を形成するのかは分かっていない。

Henchらこれまでに、Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅系においてガラス表面のアパタイト形成はある種の組成に限られることを示した^{17,18)}。KokuboらはNa₂Oを含まないMgO-CaO-SiO₂-P₂O₅系ガラス^{19,20)}及び結晶化ガラス^{21,22)}もまた、表面アパタイト

層を形成することを示し、さらにそれらの表面でのアパタイト形成機構に基づき、 P_2O_5 を含まない $CaO-SiO_2$ 系ガラスも、また表面アパタイト層を形成することを示唆した。一方、ある研究者は、生体活性を示すためにはアパタイトを構成する CaO と P_2O_5 の両者を含むべきであると考えている^{23, 24)}。

本研究では、無機質ガラスの生体活性の組成依存性を基礎的に明らかにするために、単純な $CaO-SiO_2-P_2O_5$ 3成分系において種々の組成のガラスをヒトの血漿成分とほぼ等しい無機イオン濃度を有し、細胞を含まない擬似体液に浸漬し、その表面におけるアパタイト形成を調べた²⁵⁾。この液を用いると、生体活性な無機質ガラス及び結晶化ガラス表面でのアパタイト形成を再現できることがすでに確かめられている²⁶⁾。現在実用化されているすべての生体活性な無機質ガラス及び結晶化ガラスは、この3成分を基礎にしている。この種の基礎的な研究は、新しい種類のガラス及び結晶化ガラスを開発するために必要である。

2 実験方法

2.1. ガラスの調製

CaO-SiO₂-P₂O₅系におけるガラス形成組成域は、これまでに報告されていない。化学試薬のCaCO₃、SiO₂、CaHPO₄・2H₂O及びH₃PO₄を本系の種々の組成になるように混合し、その原料粉末20gを50mlの白金るつぽに入れ、MoSi₂炉中にて1600℃で1時間熔融し、融液を室温の鉄板状に流し出し、上から別の鉄板で抑えて、厚さ約1mmの板状の固体にし、その固体をSiC炉中にて適当な温度から炉冷した。得られた物質は肉眼観察及びX線回折によって、結晶相を含むか否かを調べた。

2.2. 擬似体液への浸漬

得られたガラスから15×10×1 mm³の大きさの板状試料を切り出し、その表面を3~4 μmφのダイヤモンドペーストで研磨し、アセトン及びイオン交換水でこの順に洗浄した後、表1に示す細胞を含まず無機イオン濃度をヒトの血漿成分のそれにほぼ等しくした擬似体液35mlに浸漬した²⁵⁾。擬似体液は、イオン交換水に化学試薬のNaCl、NaHCO₃、KCl、K₂HPO₄、MgCl₂・6H₂O、CaCl₂及びNa₂SO₄を溶かして調製した。液は、緩衝剤としてトリスヒドロキシメチルアミノメタン((CH₂OH)₃CNH₂) 50mMと塩酸(HCl) 45mMを加えて、pHを7.25に保ち、その温度を36.5℃に保った。

2.3. 表面構造の分析

擬似体液に7, 20及び30日浸漬後、液から試料を取り出し、アセトンで軽く洗浄した。擬似体液に浸漬された試料の表面を薄膜X線回折、フーリエ変換赤外反射分光法及び走査型電子顕微鏡観察により調べた。X線回折には、Rigaku 2651A1薄膜アタッチメントを用い、X線の試料表面への入射角は1°で行った。赤外分光法には、日本分光FT-IR-5M分光光度計を用い、反射角75°で行った。両者の手法を

用いれば、表面の厚さ約 $1\mu\text{m}$ の層だけの分析が可能になる。走査電子顕微鏡観察は、試料表面に白金の薄膜をコーティングし、日立S-450型走査電子顕微鏡を用いて行った。

3 結果

図1に2.1節で述べた溶融及び冷却条件下での、 $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 系における種々の組成の融液のガラス形成の傾向を示す。図1からガラスは2つの組成域で得られることが分かる。すなわち、1つは $\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ 組成付近であり、もう1つは P_2O_5 を40 mol%以上含む組成である。 $\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ 付近の組成域では、二相分離するガラスがいくつか見られた。

参考のために得られたガラスのいくつかについて、表面の薄膜X線回折図とフーリエ変換赤外反射スペクトルを図2に示す。それらの組成を表2に示す。

同じガラスを擬似体液に7日間浸漬した後の表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトルを、それぞれ図3及び4に示す。図3及び4には、すでに報告されているデータ²²⁾に基づいた帰属も示した。図3及び4から、 $\text{Ca}_{50}\text{Si}_{50}$ 、 $\text{Ca}_{50}\text{Si}_{45}\text{P}_5$ 及び $\text{Ca}_{60}\text{Si}_{30}\text{P}_{10}$ ガラスは擬似体液において、7日でそれらの表面にアパタイト相を形成するが、 $\text{Ca}_{35}\text{Si}_{65}$ 、 $\text{Ca}_{50}\text{Si}_{5}\text{P}_{45}$ 及び $\text{Ca}_{50}\text{P}_{50}$ ガラスは形成しないことが分かる。同アパタイト相はブロードなX線回折ピークと 1400cm^{-1} の赤外反射ピークによって特徴付けられる。このことは同アパタイト相が、天然の骨と同種の、結晶子が小さいか格子欠陥の多い炭酸イオン含有水酸アパタイトであることを示している。アパタイトに帰属されるX線回折及び赤外反射ピークの強度は、 $\text{Ca}_{50}\text{Si}_{45}\text{P}_5$ 及び $\text{Ca}_{60}\text{Si}_{30}\text{P}_{10}$ ガラスについて、 $\text{Ca}_{50}\text{Si}_{50}$ ガラスよりも大きい。このことは、アパタイトの形成速度が後者よりも前者のについての方が大きいことを示している。

同じガラスを擬似体液に20日間浸漬した後の表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトルを、それぞれ図5及び6に示す。これらの回折図とスペクトルは図3及び4に示したものと本質的に同じである。

同じガラスを擬似体液に30日間浸漬した後の表面の薄膜X線回折図及びフーリ

エ変換赤外反射スペクトルを、それぞれ図7及び8に示す。図7及び8から、30日浸漬後には、Ca₃₅Si₆₅ガラス表面にもアパタイト相が形成されるが、Ca₅₀Si₅P₄₅及びCa₅₀P₅₀ガラスでは30日浸漬後もアパタイト相を形成しないことが分かる。

図9に、30日浸漬後の同じガラス表面の走査電子顕微鏡写真を示す。図9からCa₃₅Si₆₅、Ca₅₀Si₅₀、Ca₅₀Si₄₅P₅及びCa₆₀Si₃₀P₁₀ガラスの表面には、鱗片状の粒子が沈着するが、Ca₅₀Si₅P₄₅及びCa₅₀P₅₀ガラス表面には沈着しないことが分かる。この鱗片状粒子の形態は結晶化ガラスA-W²²⁾及びCeravital型の結晶化ガラス²³⁾の表面に生成するアパタイトのそれに非常によく類似している。

以上の結果と他の組成のガラスの結果を図10にまとめる。図10から、P₂O₅を含まないCaO-SiO₂系ガラス及びそれに少量のP₂O₅を含むガラスは、擬似体液中でそれらの表面にアパタイト相を形成するが、SiO₂を含まないCaO-P₂O₅系ガラス及びそれにSiO₂を加えたガラスは同相を形成しないことが分かる。SiO₂をかなり多量に含むCaO-P₂O₅系ガラスは、擬似体液中において著しく溶解した。

4 考察

Henchら^{9,10)}及びKokubo^{13,14,22,27)}らの研究によれば、無機質ガラス及び結晶化ガラスが骨と結合するための必須条件は、体内でその表面にアパタイト層を作ることである。このアパタイト層は、表1に示した擬似体液中でもその表面に再現される²⁶⁾。これらの知見に基づけば、図10に与えられた結果から、生体活性を示すガラス及び結晶化ガラスは、CaO-P₂O₅系よりもむしろCaO-SiO₂系を基礎とした組成で得られると言える。これは、生体活性を示すためには、ガラス及び結晶化ガラスはアパタイトの構成成分であるCaOとP₂O₅を両方含まなければならないという、これまでの考え方とは対照的である。

これらの結果は以下のように説明される。Kokuboら^{13,14)}のこれまでの研究によれば、結晶化ガラスA-Wは、同結晶化ガラスのガラス相とウォラストナイトから溶出したCa(II)とSi(IV)イオンが、周囲の体液に存在するP(V)イオンと化学反応し、その表面にアパタイト層を形成する。この反応において、Ca(II)イオンは、すでにアパタイトに対して過飽和である周囲の体液のアパタイトに対する過飽和の程度を高め、Si(IV)イオンは結晶化ガラス表面でアパタイトの核形成に有利な位置を提供する。P₂O₅を含まないCaO-SiO₂系ガラスの体液環境下でのアパタイト生成も同様に説明される。アパタイトの形成に必要なリン酸イオンは、体液のみから供給される。Ca₃₅Si₆₅ガラスよりもCa₅₀Si₅₀ガラスのアパタイト形成速度が高いのは、後者のガラスのCa(II)及びSi(IV)イオンの溶出速度が高いことによる。P₂O₅を少量含むCaO-SiO₂系ガラスについては、溶出したリン酸イオンが周囲の液のアパタイトに対する過飽和の程度を上昇させ、その結果アパタイトの形成速度を高めたのであろう。Ca₅₀Si₅₀ガラスよりもCa₅₀Si₄₅P₅及びCa₆₀Si₃₀P₁₀ガラスにおいて、アパタイトの形成速度が大きかったのは、このように説明される。SiO₂含まないかもしくはある量のSiO₂を含むCaO-P₂O₅系ガラスについては、多量

のリン酸イオンが溶出し、周囲の液のpHを下げ、その結果アパタイト形成を抑制したと考えられる。表面アパタイトの形成と溶出イオンの関係については、後の章で詳細に検討する。

in vivo 実験により、 P_2O_5 を含まないCa50Si50ガラスは、その表面にCaとPに富む層を形成し、骨と結合するが、 SiO_2 を含まないCa50P50ガラスは骨と結合しないことが確かめられている。本研究の結果は、これらとよく一致している。

5. 総括

無機質ガラス及び結晶化ガラスが、生体骨と結合するための必須条件は体内でその表面にアパタイト層を形成することである。このアパタイト層は、細胞を含まずイオン濃度をヒトの血漿にほぼ等しくした擬似体液中においても、それらの表面に再現できる。本研究では、無機質ガラスの生体活性の組成依存性を基礎的に明らかにするために、擬似体液中におけるCaO-SiO₂-P₂O₅系ガラス表面のアパタイト形成を調べた。アパタイト形成は、薄膜X線回折、フーリエ変換赤外反射分光法及び走査電子顕微鏡観察により調べた。P₂O₅を含まないか、または少量のP₂O₅を含むCaO-SiO₂ガラスは、その表面にアパタイト層を形成するが、SiO₂を含まないCaO-P₂O₅ガラスや、これにSiO₂を含むガラスは、同層を形成しないことが明かとなった。このことから、生体活性なガラス及び結晶化ガラスは、一般に考えられているのとは異なり、CaO-P₂O₅よりむしろ、CaO-SiO₂を基礎とした組成において得られることが明かとなった。これらの結果は、ガラスから溶出するイオンによって説明されると考えられる。

参考文献

- 1) L. L. Hench, R. J. Splinter, W C. Allen and T K. Greenlee, J Biomed. Mater. Res. Symp., No. 2 (part 1) (1972) p. 117.
- 2) B. A. Blencke, H. Bromer and K. Deutscher, Med. Orthop. Tech., 95, (1975) 144.
- 3) T Kokubo, M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T Nakamura, T. Yamamuro and S. Higashi, Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ , 60 (1982) 260.
- 4) W. Höland, K. Naumann, W. Vogel and J Gummel, Wiss. Z. Freidrich-Schiller-Univ. Jena, math.-nat. Reihe, 32 (1983) 571.
- 5) J. Wilson, "Glass-Current Issues", edited by A. F Wright and J. Dupuy (Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1985) p. 662.
- 6) H. Brömer, K. Deutscher, B. Blencke, E. Pfeil and V Strung, "Science of Ceramic", Vol. 9, 1977. p. 219.
- 7) T. Yamamuro, J. Shikata, H. Okumura, T. Nakamura, S. Yoshii, K. Ono and T Kitsugi, "Bioceramics", Vol. 1, edited by H. Oonishi, H. Aoki and K. Sawai (Ishiyaku EuroAmerica, Tokyo, 1989) p. 175.
- 8) V J Gummel, H. Zippel and H. Hahnel, Z. Klin. Med., 43 (1988) 1791.
- 9) L. L. Hench, "Fundamental Aspects of Biocompatibility", Vol. 1, edited by D. F Williams (CRC Press, Boca Raton, 1981) p. 67
- 10) L. L. Hench and A. E. Clark, "Biocompatibility of Orthopaedic Implants", Vol. II, edited by D. F Williams (CRC Press, Boca Raton, 1982) p. 129.

- 11) U. Gross, J Braudes, V Strunz, I Bab and J Sela, J. Biomed. Mater Res., 15 (1981) 291.
- 12) U. Gross and V Strunz, J Biomed. Mater Res., 19 (1985) 251.
- 13) T. Kokubo, J Non-Cryst. Solid, 120 (1990) 138.
- 14) T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, Y Ebisawa, T Kitsugi, K. Oura, S. Kotani and T. Yamamuro, "Proceedings of XV International Congress on Glass", Vol. 3a, edited by O. V Mazurin (Nauka, Leningrad, 1989) p. 114.
- 15) K. H. Karlsson, K. Froberg and T Ringbon, J Non-Cryst. Solids, 112 (1989) 69.
- 16) O. H. Andersson, K. H. Karlsson and K. Kanganiemi, J Non-Cryst. Solids, in press.
- 17) M. Ogino and L. L. Hench, J. Non-Cryst. Solids, 38/39 (1980) 673.
- 18) M. Ogino, F Ohuchi, and L. L. Hench, J. Biomed. Mater Res., 14, 55 (1980) 55.
- 19) T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura and T. Kokubo, J. Biomed. Mater Res., 23 (1989) 631.
- 20) T. Kokubo, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, M. Takagi and T. Shibuya, "Ceramics in Clinical Applications", edited by P Vincenzini (Elsevier, Amsterdam, 1987) p. 175.
- 21) T. Kitsugi, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, T. Shibuya and M. Takagi, J Biomed. Mater Res., 21 (1987) 1255.
- 22) T Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, and T Yamamuro, J. Biomed. Mater. Res., 24 (1990) 331.
- 23) Y. Abe and H. Fukui, Shikarikougaku-zasshi, 16 (1975) 196.

- 24) F. Pernot, J Zarzycki, F Bonnel, P Rabischong and P Baldet, J.
Mater Sci , 14 (1979) 1694.
- 25) J. Gamble, "Chemical Anatomy, Physiology and Pathology of
Extracellular Fluid", 6 ed. (Harvard University Press, Cambridge,
1967) p. 1.
- 26) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro, J
Biomed. Mater Res., 24 (1990) 721.
- 27) C. Ohtsuki, H. Kushitani, T. Kokubo, S. Kotani, and T. Yamamuro, J.
Biomed. Mater Res., 95 (1991) 1363.
- 28) K. Ohura, T Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, Y Ebisawa, Y.
Kotoura and M. Oka, J. Biomed. Mater Res., 25, (1991) 357.
- 29) K. Takatsuka et al., to be published.

表 1. 擬似体液及びヒトの血漿のイオン濃度。

	Ion concentration (mM)	
	Simulated fluid	Blood plasma
Na^+	142.0	142.0
K^+	5.0	5.0
Mg^{2+}	1.5	1.5
Ca^{2+}	2.5	2.5
Cl^-	147.8	103.0
HCO_3^-	4.2	27.0
HPO_4^{2-}	1.0	1.0
SO_4^{2-}	0.5	0.5

表 2. 実験に用いたいくつかのガラスの組成。

Name	Composition (mol%)			
	CaO	SiO ₂	P ₂ O ₅	
Ca50P50	50	0	50	
Ca50Si5P45	50	5	45	
Ca60Si30P10	60	30	10	
Ca50Si45P5	50	45	5	
Ca50Si50	50	50	0	
Ca35Si65	35	65	0	

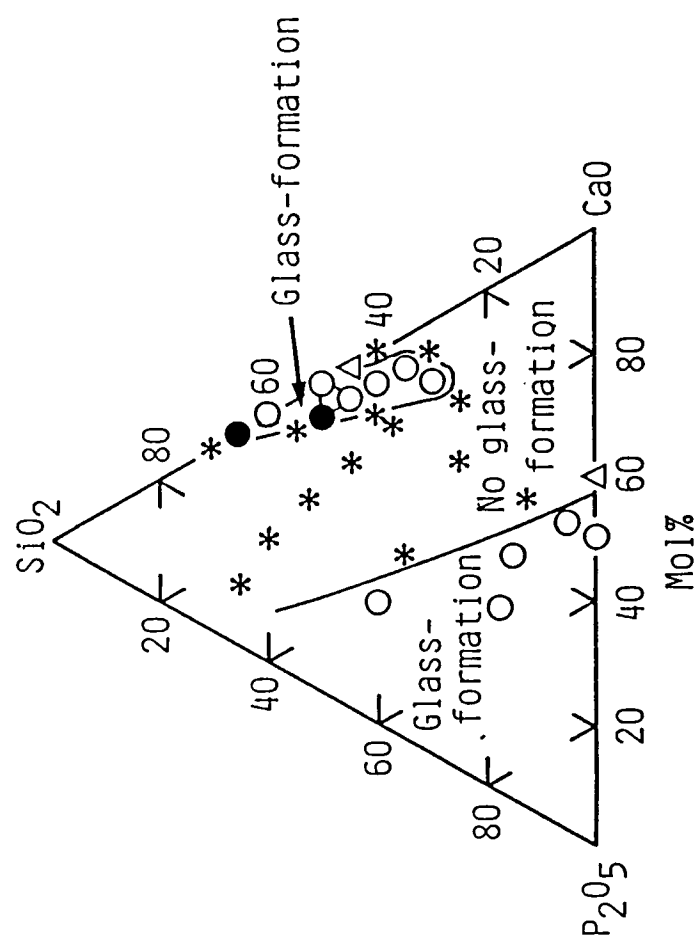


図 1. $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 系の融液のガラス化傾向。
 ○: 透明なガラスを形成, ●: 不透明なガラスを形成,
 △: 部分的に失透, *: 溶融せず。

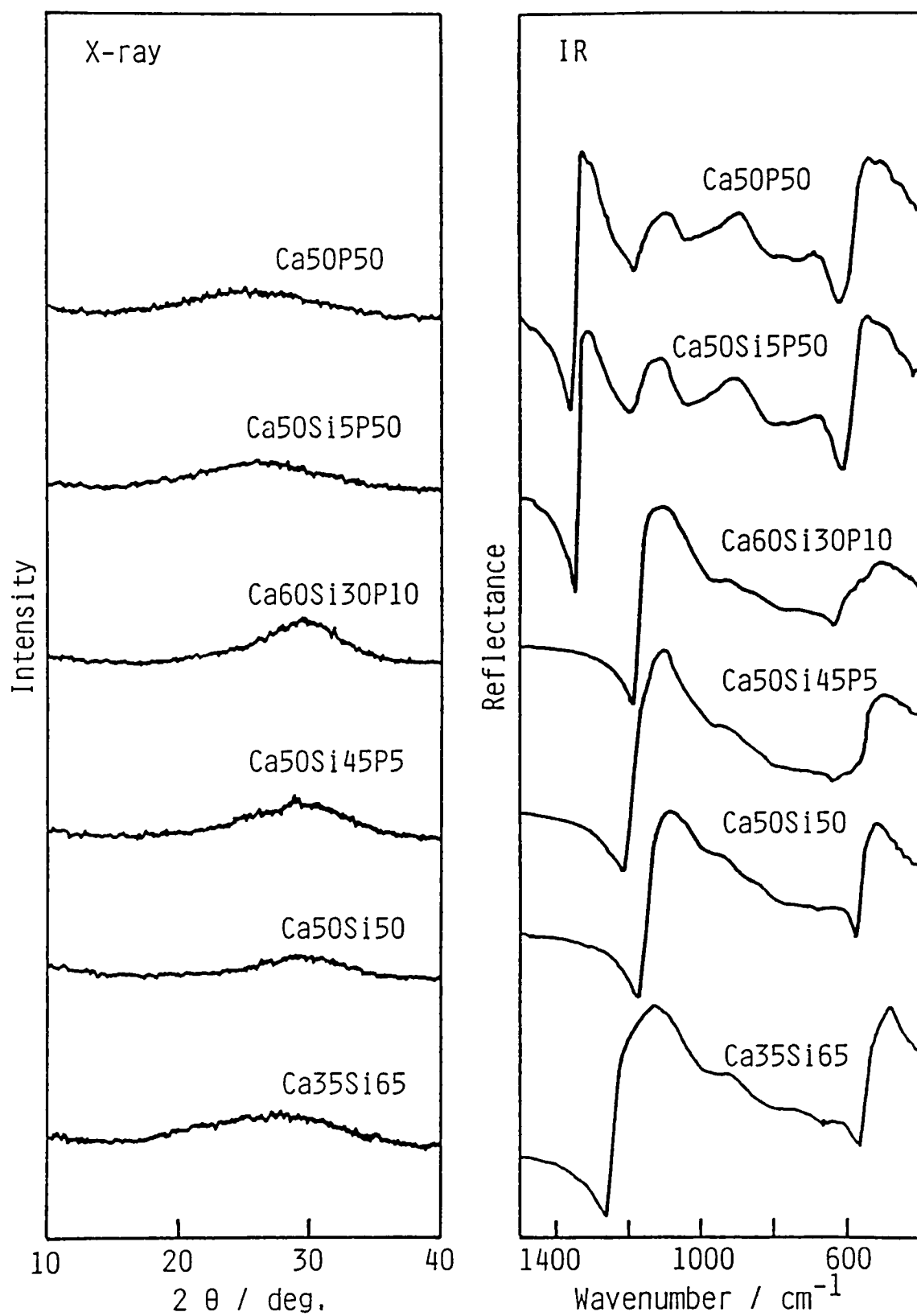


図2. 擬似体液浸漬前のいくつかの $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 系ガラス表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトル。

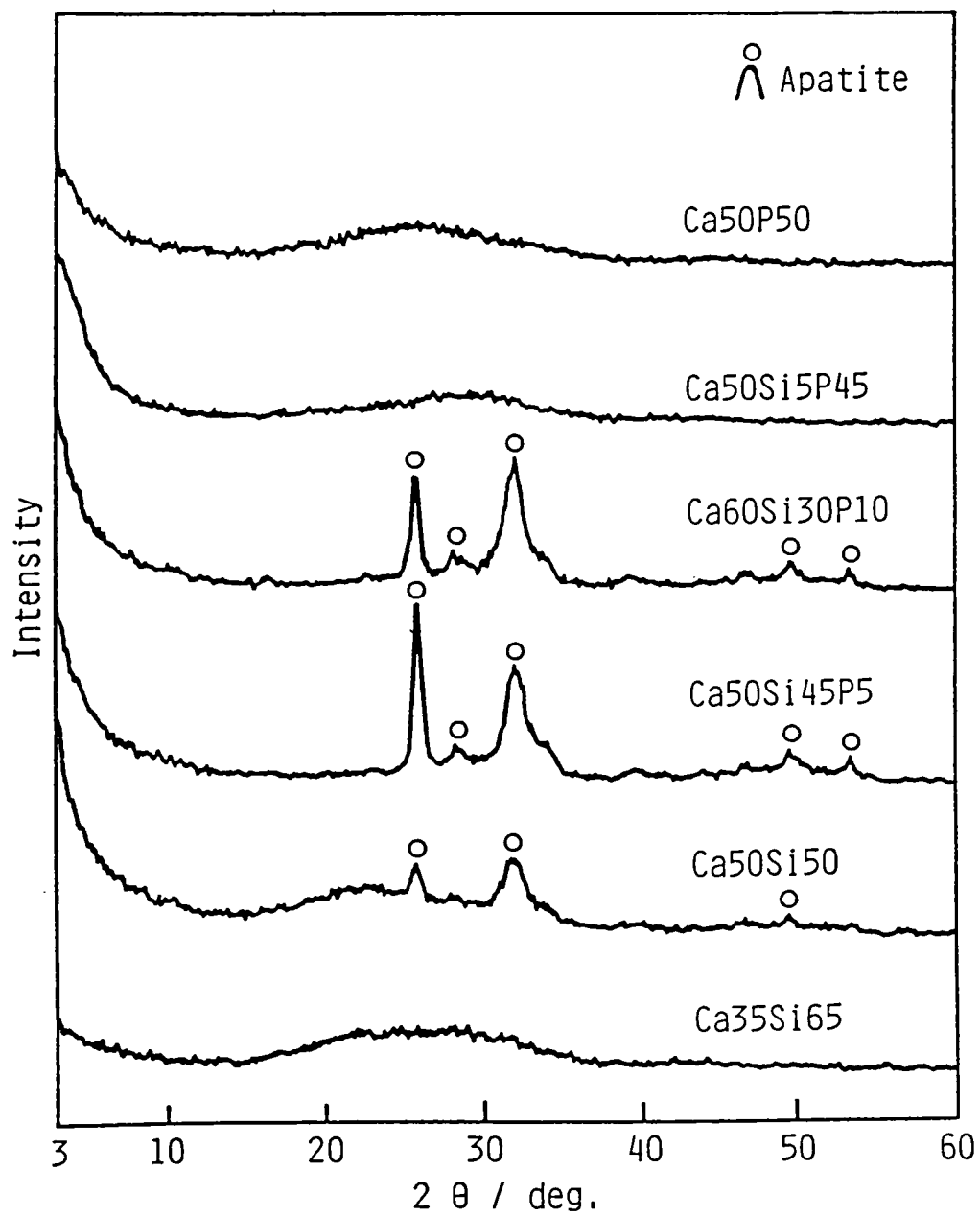


図 3. 擬似体液に7日間浸漬したいくつかのCaO-SiO₂-P₂O₅系ガラス表面の薄膜X線回折図。

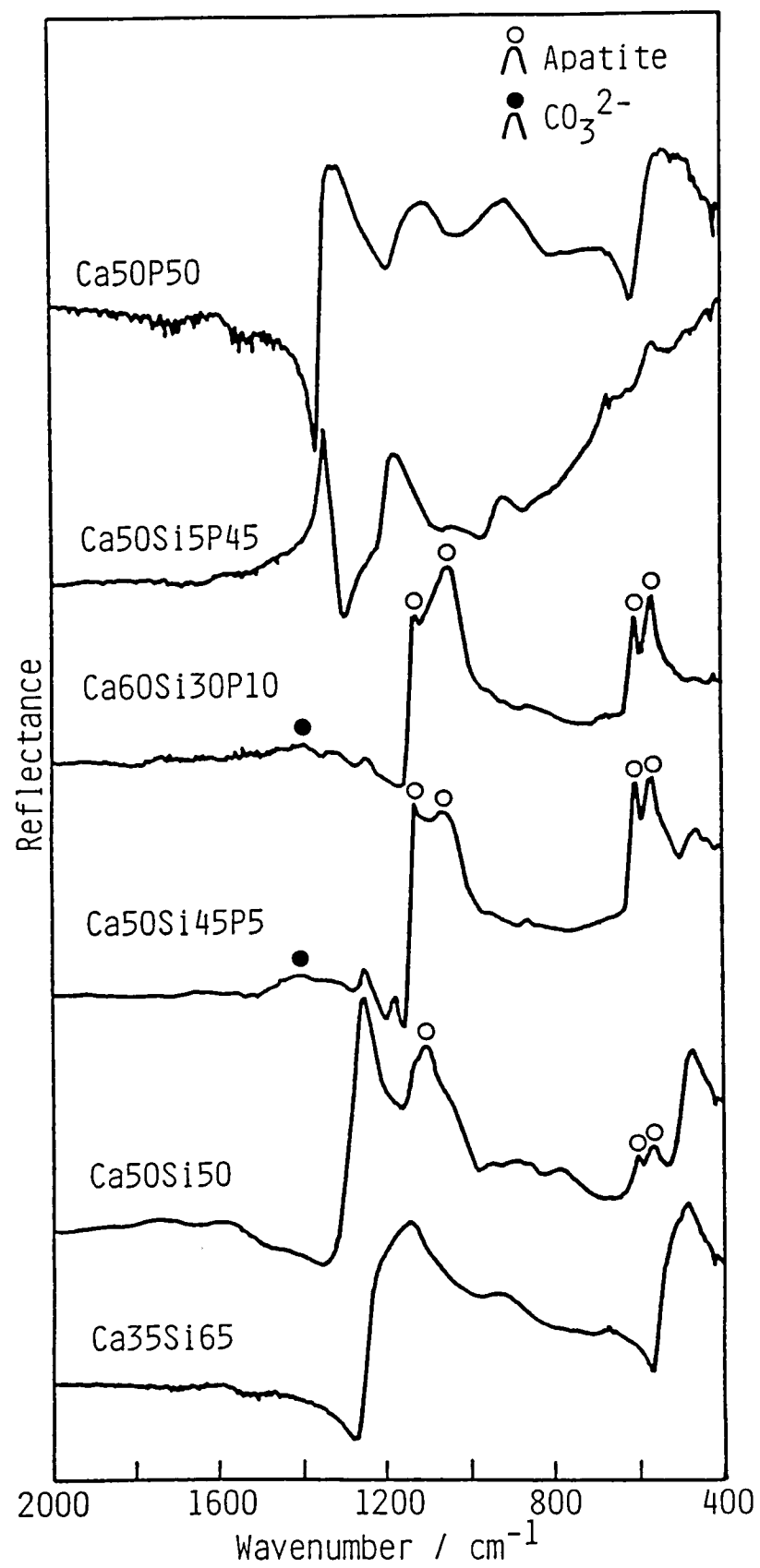


図 4. 擬似体液に7日間浸漬したいくつかの $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 系ガラス表面のフーリエ変換赤外反射スペクトル。

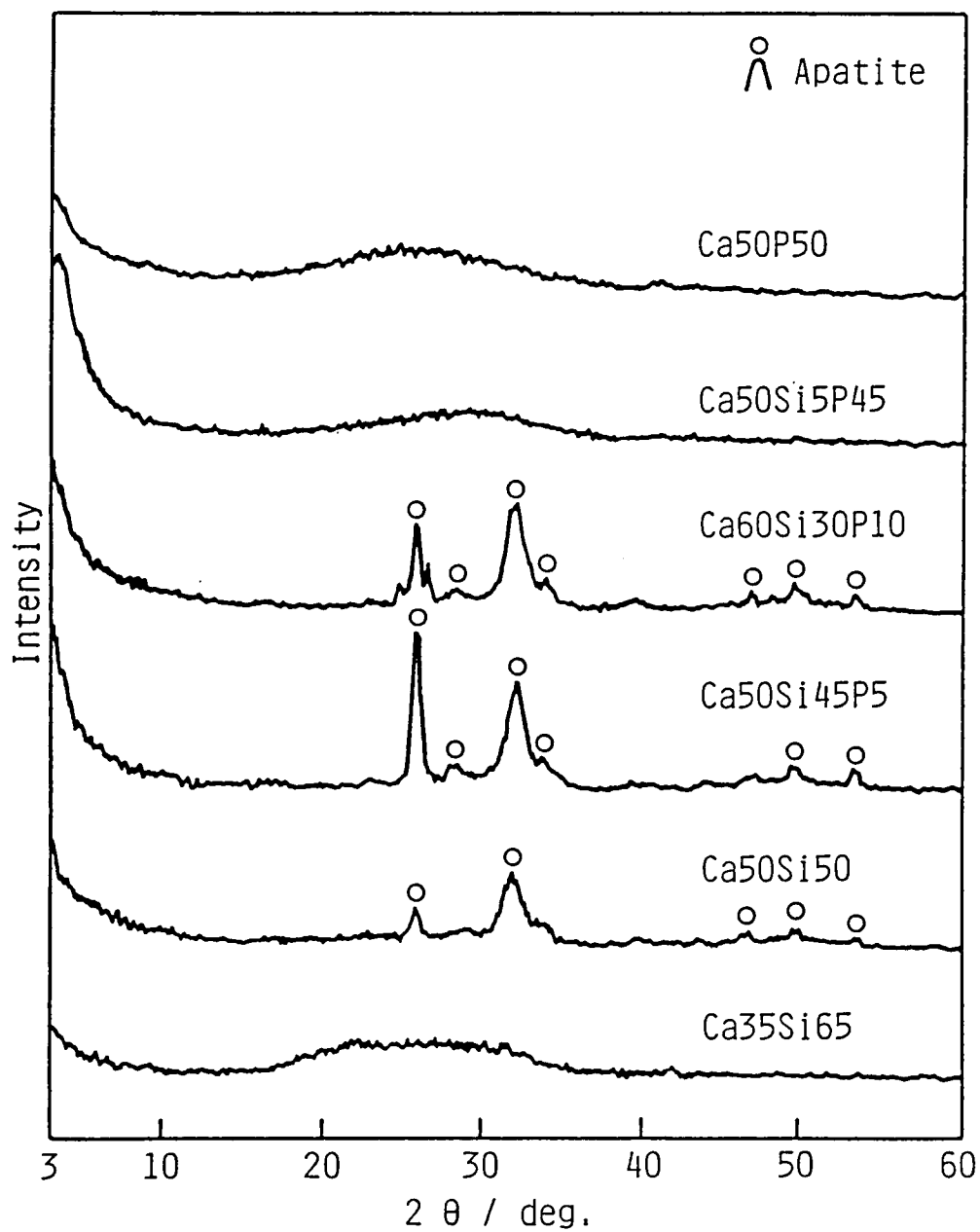


図 5 擬似体液に20日間浸漬したいくつかのCaO-SiO₂-P₂O₅系ガラス表面の薄膜X線回折図。

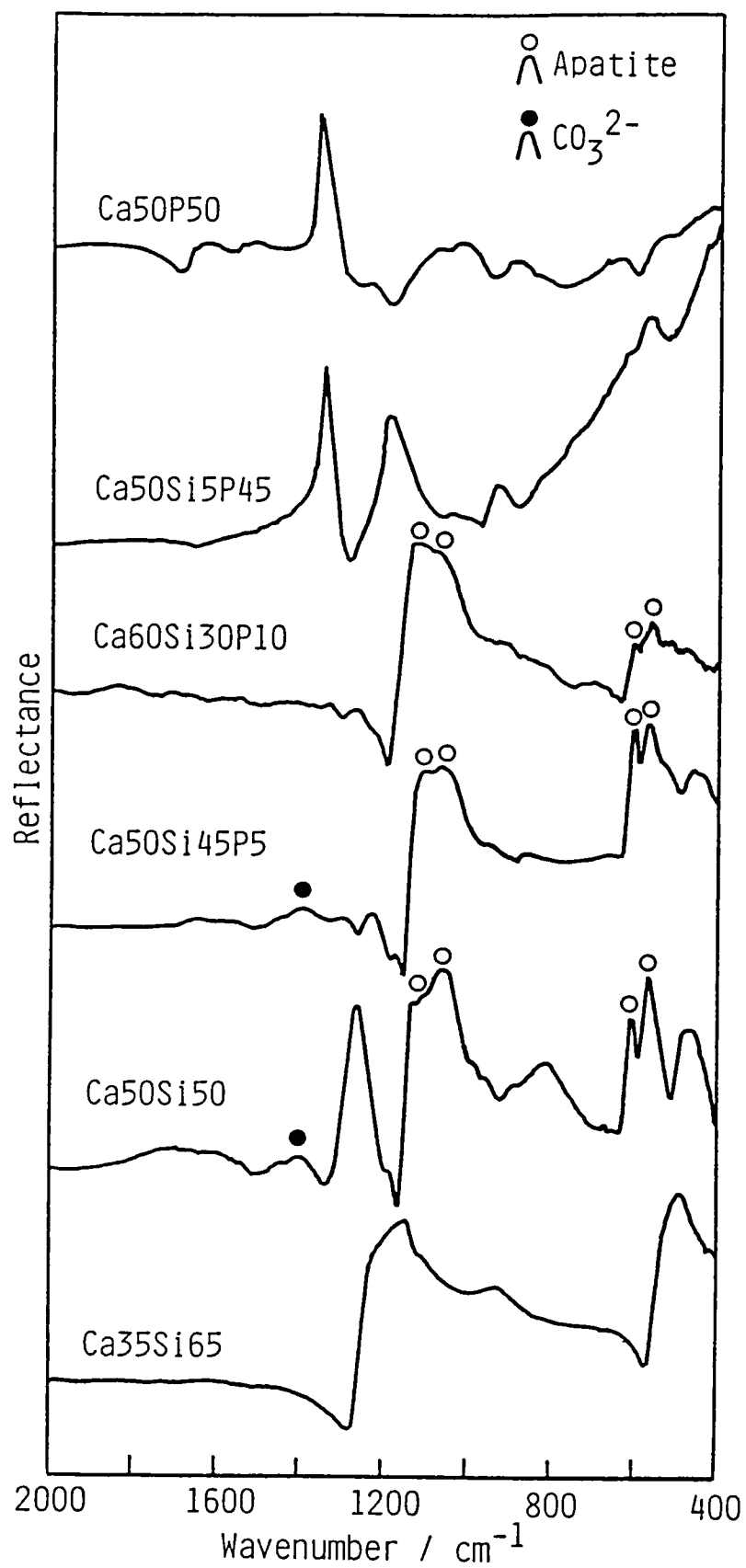


図 6 擬似体液に20日間浸漬したいくつかの $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 系ガラス表面のフーリエ変換赤外反射スペクトル。

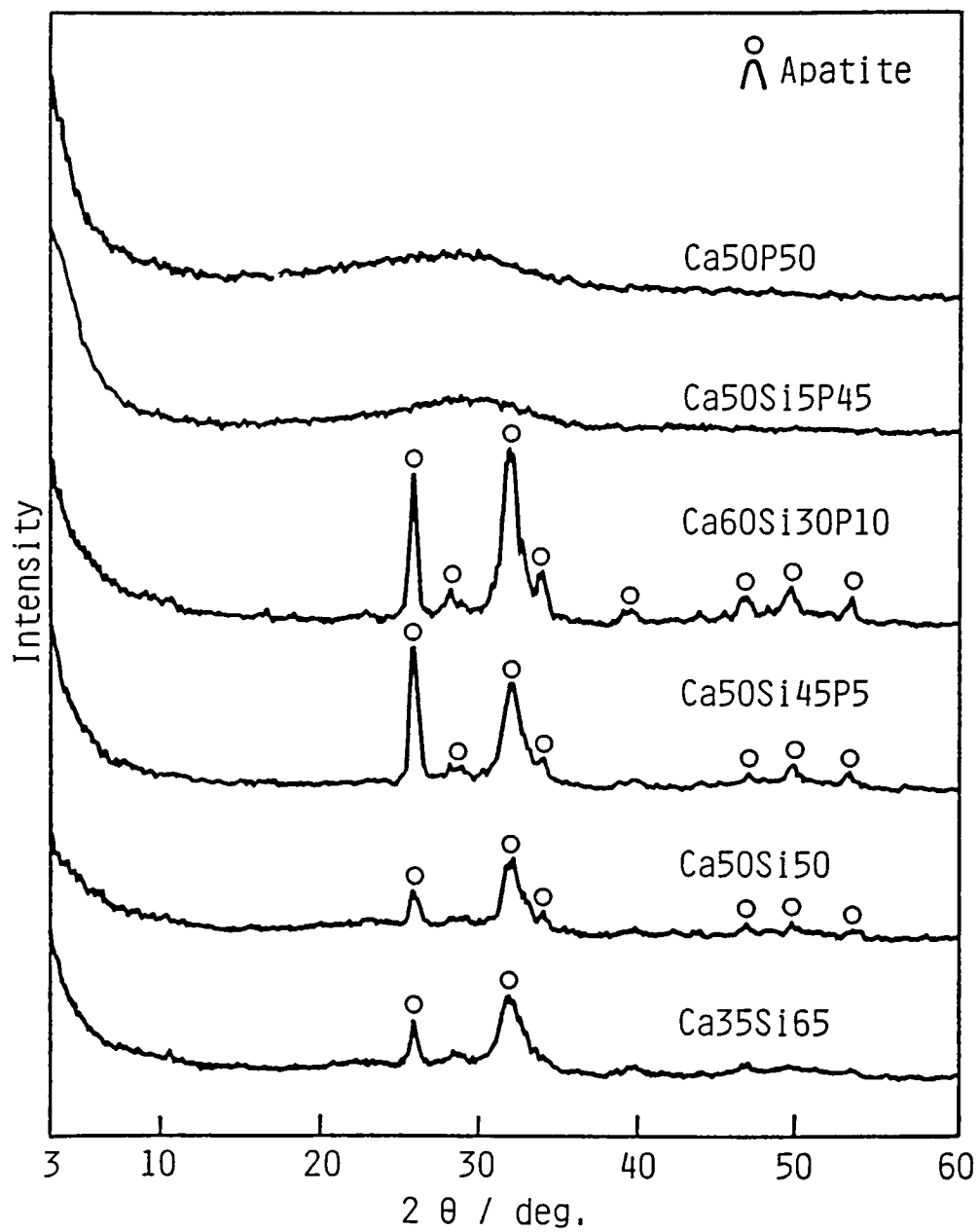


図 7 擬似体液に30日間浸漬したいくつかのCaO-SiO₂-P₂O₅系ガラス表面の薄膜X線回折図。

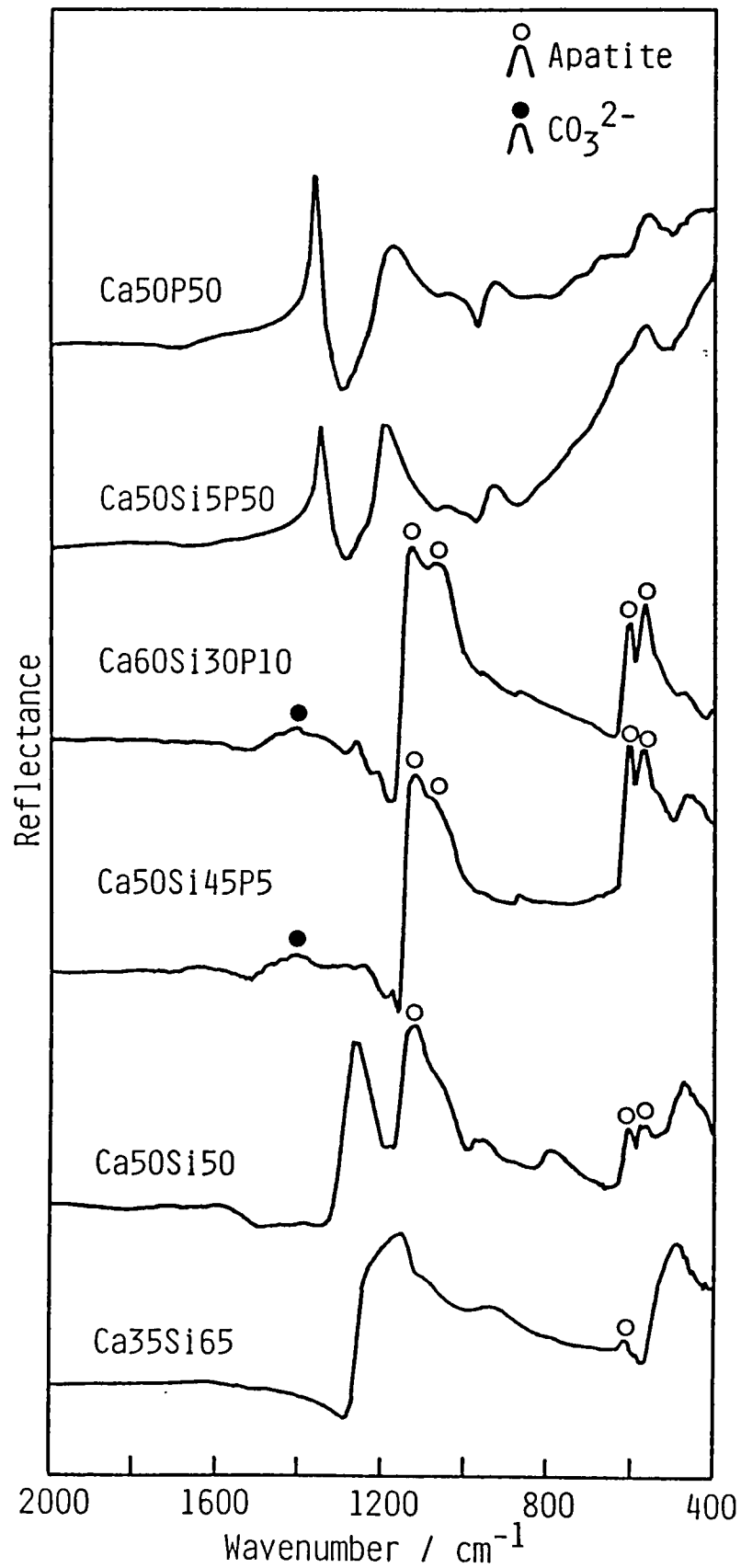


図 8 擬似体液に30日間浸漬したいくつかの $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 系ガラス表面のフーリエ変換赤外反射スペクトル。

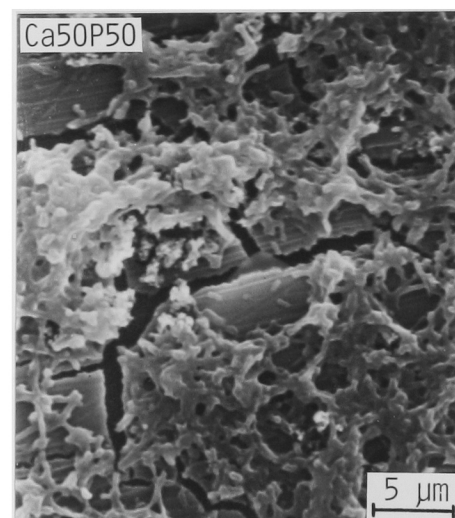
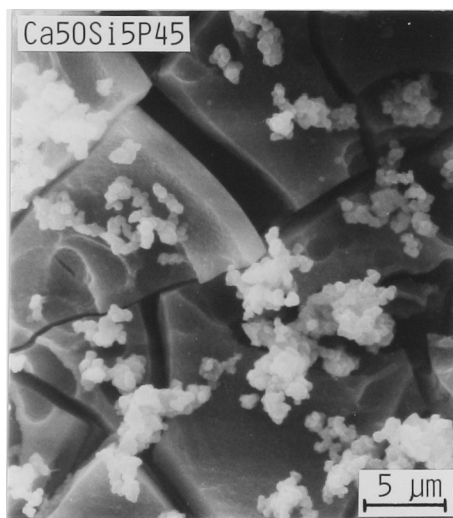
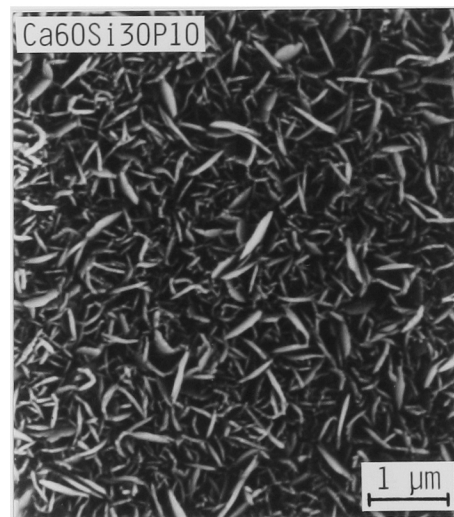
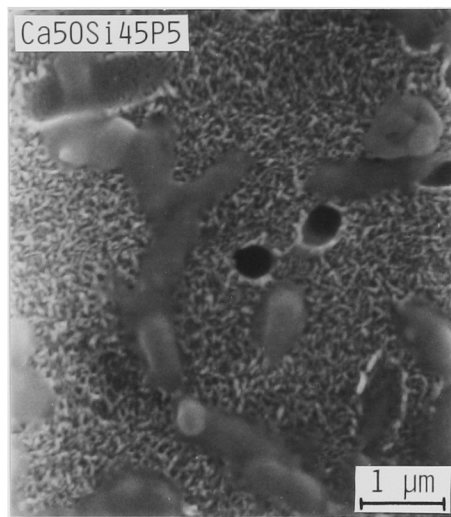
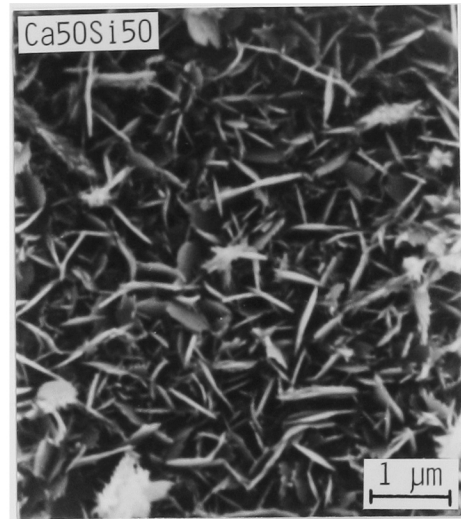
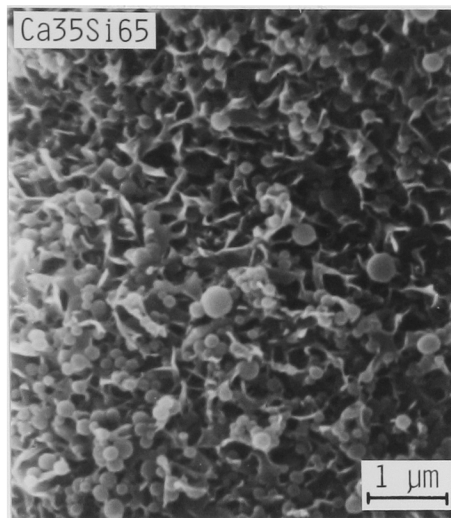


図 9. 擬似体液に30日間浸漬したいくつかのCaO-SiO₂-P₂O₅系ガラス表面の走査電子顕微鏡写真。

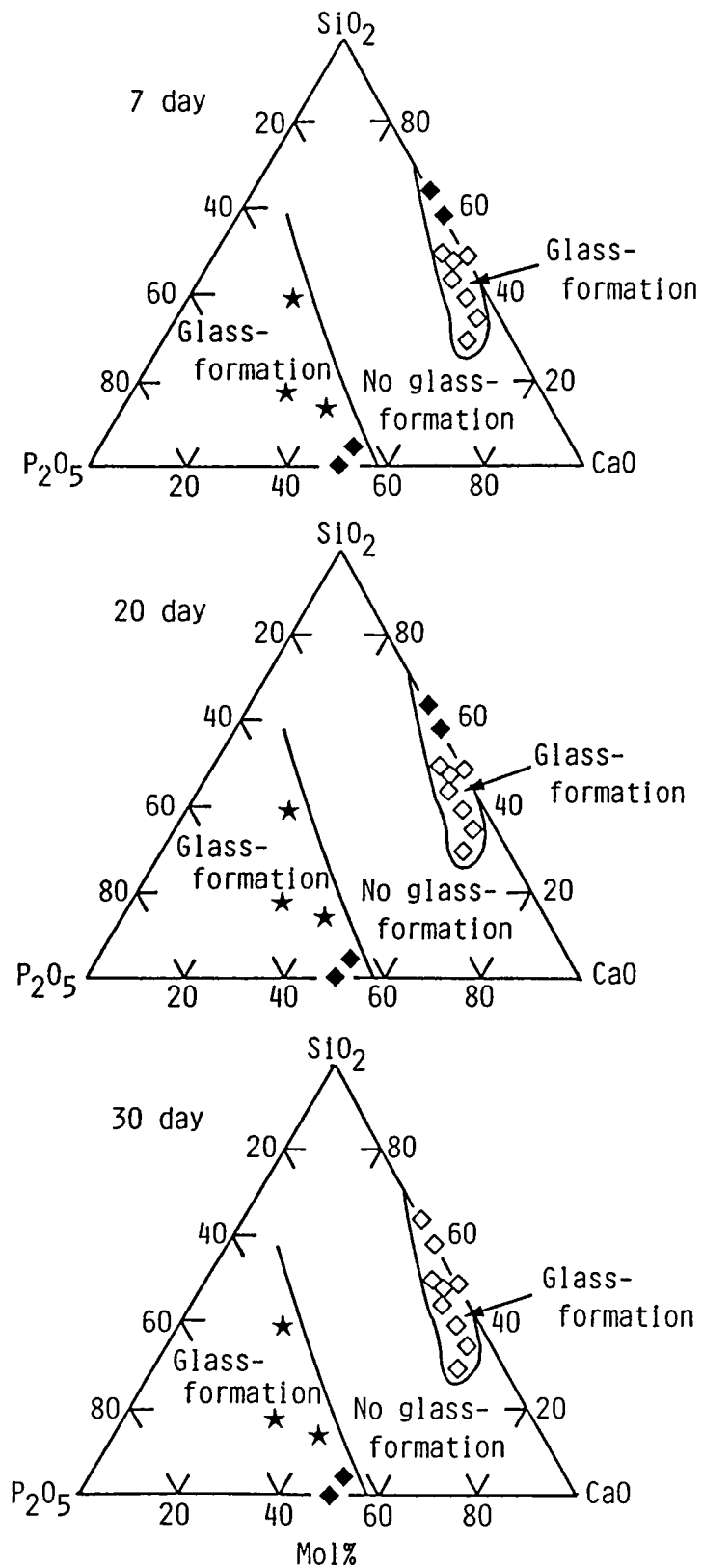


図 10. 擬似体液中における CaO - SiO_2 - P_2O_5 系ガラス表面でのアパタイト形成の組成依存性。

◇: アパタイト形成, ◆: アパタイト形成せず, ★: 溶解。

第3章

CaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラスの生体活性の組成依存性：*in vitro* 評価

1 緒言

MgO-CaO-SiO₂系ガラス相中にアパタイトとウォラストナイトを析出させた結晶化ガラスA-Wは骨と直接結合する¹⁾が、MgO-CaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラス相中に同種の結晶相を析出させた結晶化ガラスA-W(Al)は骨と結合しない²⁾。同様のAl₂O₃が生体活性を抑制する効果は、Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅系のBioglass型のガラス³⁾やNa₂O-K₂O-MgO-CaO-SiO₂-P₂O₅系のCeravital型のアパタイト含有結晶化ガラス⁴⁾についても報告されている。しかしながら、何故Al₂O₃が無機質ガラス及び結晶化ガラスの生体活性を著しく抑制するのかは、基礎的に明らかにされていない。

本研究ではこの点を明らかにするために、CaO-SiO₂-Al₂O₃系のガラスの生体活性の組成依存性を*in vitro*で調べた。CaO-SiO₂ 2成分系ガラスは生体活性を示すことが知られている最も単純なガラスである⁵⁻⁶⁾ので、この種の基礎研究の基本となるガラスに適している。Bioglass型のガラス、Ceravital型の結晶化ガラス及びA-W型の結晶化ガラスなどの種々の無機質ガラス及び結晶化ガラスに関する研究により、無機質ガラス及び結晶化ガラスが骨と結合するための必須条件は、体内でそれら表面にアパタイト層を形成することであり⁷⁻¹⁴⁾、同アパタイト層はヒトの血漿成分とほぼ等しい無機イオン濃度を有し、細胞を含まない擬似体液中でもその表面に再現されることが知られている¹⁵⁻¹⁸⁾。本研究では、薄膜X線回折、フーリエ変換赤外反射分光法及び走査電子顕微鏡を用い、擬似体液中における表

面でのアパタイト形成を調べることで、ガラスの生体活性を評価した。

2 実験方法

2.1. ガラスの調製

CaO-SiO₂-Al₂O₃系において、通常の熔融法によりガラスが作られる組成域は、先にImaokaら¹⁹⁾により報告されている。化学試薬のCaCO₃、SiO₂及びAl₂O₃を、本系のガラス形成組成域の中で、種々の組成になるように混合し、その原料粉末20gを50mlの白金るつぼに入れ、MoSi₂炉中にて1600℃で1時間熔融し、融液を室温の鉄板状に流し出し、上から別の鉄板で抑えて、厚さ約1mmの板状の固体にし、その固体をSiC炉中にて適当な温度から炉冷した。得られた物質は肉眼観察及びX線回折によって、結晶相を含むか否かを調べた。

2.2. 擬似体液への浸漬

得られたガラスから15×10×1 mm³の大きさの板状試料を切り出し、その表面を3~4 μmφのダイヤモンドペーストで研磨し、アセトン及びイオン交換水でこの順に洗浄した後、表1に示す細胞を含まず無機イオン濃度をヒトの血漿成分のそれにほぼ等しくした擬似体液35mlに浸漬した²⁰⁾。擬似体液は、イオン交換水に化学試薬のNaCl、NaHCO₃、KCl、K₂HPO₄、MgCl₂・6H₂O、CaCl₂及びNa₂SO₄を溶かして調製した。液は、緩衝剤としてトリスヒドロキシメチルアミノメタン((CH₂OH)₃CNH₂) 50mMと塩酸(HCl) 45mMを加えて、pHを7.25に保ち、その温度を36.5℃に保った。

2.3. 表面構造の分析

擬似体液に7, 20及び30日浸漬後、液から試料を取り出し、アセトンで軽く洗浄した。擬似体液に浸漬された試料の表面を薄膜X線回折、フーリエ変換赤外反射分光法及び走査電子顕微鏡観察により調べた。X線回折には、Rigaku CN2651A2薄膜アタッチメントを用い、X線の試料表面への入射角は1°で行った。赤外分光法

には、日本分光FT-IR-5M分光光度計を用い、反射角75°で行った。両者の手法を用いれば、表面の厚さ約1 μ mの層だけの分析が可能になる。走査型電子顕微鏡観察は、試料表面に金-パラジウム合金の薄膜をコーティングし、日立S2500CX走査電子顕微鏡を用いて行った。

3 結果と考察

図1に、調べたガラスの組成とそれらの外観を示す。

参考のために、図2に擬似体液に浸漬する前のいくつかのガラス表面の薄膜X線回折図とフーリエ変換赤外反射スペクトルを示す。それらの組成を表2に示す。

擬似体液に7日間浸漬した後の同じガラス表面の薄膜X線回折図とフーリエ変換赤外反射スペクトルを、それぞれ図3及び4に示す。図3及び4には、主なピークにこれまでに報告されたデータ¹⁶⁾を基にした帰属も示した。図3及び4から、Ca50Si50ガラスは擬似体液中で7日以内に表面にアパタイト相を形成するが、Ca60Al40、Ca50Si25Al25、Ca50Si45Al5、Ca49Si49Al2及びCa49.5Si49.5Al1ガラスはアパタイトを形成しないことが分かる。

20日浸漬後の同じガラス表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトルを、それぞれ図5及び6に示す。図5及び6から、Ca50Si50に加えCa49.5Si49.5Al1ガラスも、擬似体液中で20日までにその表面にアパタイト相を形成するが、Ca60Al40、Ca50Si25Al25、Ca50Si45Al5及びCa49Si49Al2ガラスは、20日後でさえもアパタイト相を形成しないことが分かる。

30日浸漬後の同じガラス表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトルを、それぞれ図7及び8に示す。これらの回折図及びスペクトルは本質的に、20日間浸漬したガラスについての結果と同じである。

図9に擬似体液に30日浸漬した後の同じガラス表面の走査電子顕微鏡写真を示す。図9から、Ca50Si50及びCa49.5Si49.5Al1ガラスの表面には鱗片状粒子が沈着しているが、Ca49Si49Al2、Ca50Si45Al5、Ca50Si25Al25及びCa60Al40ガラスでは同粒子は沈着していないことが分かる。この鱗片状粒子の形態は、結晶化ガラスA-W¹⁶⁾及びCeravital型結晶化ガラス²¹⁾上に形成されたアパタイトの形態に非常によく類似している。Ca49Si49Al2ガラスは、化学侵食のわずかな痕跡を示したのみで

あった。後者3種のガラスは、侵食の痕跡さえ見られなかった。

擬似体液中での浸漬時間の変化に伴うガラス表面でのアパタイト形成の結果を、他の組成にと共に図10にまとめた。図10から、 Al_2O_3 を含まない CaO-SiO_2 系ガラス及び Al_2O_3 を1.5mol%以下含む $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系のガラスは擬似体液中で、30日以内にその表面にアパタイト層を形成するが、 SiO_2 を含まない $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラス及び Al_2O_3 を1.7mol%以上含む $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラスは、30日後でさえ同層を形成しないことが分かる。Kokuboら⁶⁾は先に、 Al_2O_3 を1.7mol%(2.9wt%)含む $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラスは家兎の脛骨に埋入後25週後も、その表面にほとんどCaとPに富む層を作ることなく、骨と結合しないことを報告している。

これらの結果は、ガラス組成への少量の Al_2O_3 の添加は、生体内におけるそれら表面でのアパタイト層の形成を抑制することで、ガラスや結晶化ガラスの生体活性を抑制することを示している。

これまでの結晶化ガラスA-W表面でのアパタイト形成機構の研究^{22, 23)}によれば、結晶化ガラスから溶出した Ca(II) 及び Si(IV) イオンと、周囲の体液中の P(V) イオンの化学反応によって、結晶化ガラス表面にアパタイトが形成される。この反応において、 Ca(II) イオンは通常の状態ですでにアパタイトに対しては過飽和である²⁴⁾周囲の体液の過飽和度を高め、 Si(IV) イオンは結晶化ガラス表面にアパタイトの核形成に有利な位置を与える。これらの知見に基づいて、体液環境下における Al_2O_3 を含まない CaO-SiO_2 系ガラス及び Al_2O_3 を少量含む $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラス表面でのアパタイト形成は、上述の機構と同様に説明される。アパタイト形成に必要なリン酸イオンは、周囲の体液のみから供給される。 SiO_2 を含まない $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラス及び Al_2O_3 を多量に含む $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラスの場合には、ガラスからの Ca(II) 及び Si(IV) イオンの溶出が、ガラス中に存在する Al_2O_3 によって抑制され、その結果表面でのアパタイト形成が抑制されたと考えられる。図9の走査電子顕微鏡写真によっても、この仮定は支持される。即ち、 $\text{Ca}_{50}\text{Si}_{45}\text{Al}_{15}$ 、 $\text{Ca}_{50}\text{Si}_{2}$

5Al₂O₃及びCa₆₀Al₄₀ガラスは、30日間の擬似体液に浸漬した後でさえ、化学反応の痕跡を示していない。Al₂O₃は、一般にガラスの化学的耐久性を向上させる成分として知られている²⁵⁾。Ca_{49.5}Si_{49.5}Al₁ガラスの表面におけるアパタイト形成速度がCa₅₀Si₅₀の表面においてよりも小さいのは、ガラスからのCa(II)及びSi(IV)イオンの溶出に対するAl₂O₃の抑制効果のためと説明される。

Grossら⁴⁾は、先にCeravital型の結晶化ガラスの生体活性に及ぼすAl₂O₃の抑制効果について、アパタイト層の形成には言及せず、ガラスから溶出したAl(III)イオンの周囲の骨組織の石灰化に対する抑制効果によって説明している。CaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラスの表面アパタイト形成とガラスから溶出するイオンの関係について、今後さらに詳細に検討する必要がある。

4. 総括

生体活性な無機質ガラス及び結晶化ガラスに及ぼす Al_2O_3 の影響を基礎的に明らかにするために、 $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラスにおける生体活性の組成依存性を調べた。無機質ガラス及び結晶化ガラスが骨と結合するための必須条件は、体内でその表面にアパタイト層を形成することであり、同アパタイト層はヒトの血漿成分とほぼ等しいイオン濃度を有し、細胞を含まない擬似体液中でも再現できることがすでに知られている。本研究では、擬似体液中における表面でのアパタイト形成を薄膜X線回折、フーリエ変換赤外反射分光法及び走査電子顕微鏡観察によって調べることで、ガラスの生体活性を評価した。 Al_2O_3 を含まない CaO-SiO_2 ガラスと15mol%以下の Al_2O_3 を含む $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラスは表面アパタイトを形成したが、 SiO_2 を含まない $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラス及び1.7mol%以上の Al_2O_3 を含む $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ ガラスは同層を形成しなかった。このことは、ガラス組成への少量の Al_2O_3 の添加は、体内におけるガラス表面でのアパタイト形成を妨げ、ガラスや結晶化ガラスの生体活性を抑制することを示している。

参考文献

- 1) T. Nakamura, T. Yamamuro, S. Higashi, T. Kokubo and S. Ito, J Biomed. Mater Res., 19 (1985) 685.
- 2) T. Nakamura, T. Yamamuro, S. Higashi, Y Kakutani, T Kitsugi, T. Kokubo and S. Ito, "Treatise on Biomedical Materials", Vol. 1, edited by T. Yamamuro (Kyoto Univ, Kyoto, 1983) p. 109.
- 3) R. L. Folger, C. S. Kucheria, R. E. Wells and G. E. Gardiner, "Biomaterials '84 (Transactions, Second World Congress on Biomaterials)", Vol. 7, edited by J. M. Anderson (Society for Biomaterials, Washington D. C., 1984) p. 352.
- 4) U Gross, and V Strunz, J. Biomed. Mater Res., 19 (1985) 251.
- 5) C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Takatsuka and T. Yamamuro, Nippon Seramikkusu Kyokai Gakujutsu Ronbunshi, 99 (1991) 1.
- 6) K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, Y. Ebisawa, Y Kotoura and M. Oka, J Biomed. Mater. Res., 25 (1991) 357.
- 7) L. L. Hench, "Fundamental Aspects of Biocompatibility", Vol. 1, edited by D. F. Williams (CRC Press, Boca Raton, 1981) p. 67
- 8) L. L. Hench and A. E. Clark, "Biocompatibility of Orthopaedic Implants", Vol. II, edited by D. F Williams (CRC Press, Boca Raton, 1982) p. 129.
- 9) T. Kitsugi, T Yamamuro, T Nakamura, S. Higashi, Y. Kakutani, K. Hyakuna, S. Ito, T. Kokubo, M. Takagi and T. Shibuya, J. Biomed. Mater Res., 20 (1986) 1295.
- 10) T. Kitsugi, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, T Shibuya and M.

- Takagi, J Biomed. Mater Res., 21 (1987) 1255.
- 11) T. Kokubo, C. Ohtsuki, S. Kotani, T. Kitsugi and T Yamamuro,
"Bioceramics", Vol. 2, edited by G. Heimke (German Ceramic Society,
Cologne, 1990) p. 113.
- 12) T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura and T. Kokubo, J. Biomed. Mater.
Res., 23 (1989) 631.
- 13) S. Kotani, T Yamamuro, T Nakamura, T. Kitsugi, Y Fujita, K.
Kawanabe, T. Kokubo and C. Ohtsuki, "Bioceramics", Vol. 2, edited by
G. Heimke (German Ceramic Society. Cologne, 1990) p. 105.
- 14) T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura and T. Kokubo, Internl.
Orthopaedics (SICOT), 13 (1989) 199.
- 15) T. Kokubo, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, M Takagi
and T. Shibuya, "Ceramics in Clinical Applications", edited by P.
Vincenzini (Elsevier, Amsterdam, 1987) p. 175.
- 16) T. Kokubo, S. Ito, Z. T Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi and
T. Yamamuro, J. Biomed. Mater Res., 24 (1990) 331.
- 17) T Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro, J.
Biomed. Mater. Res., 24 (1990) 721.
- 18) Y. Ebisawa, T. Kokubo, K. Ohura and T. Yamamuro, J Mater. Sci.:
Materials in Medicine, 1 (1990) 239.
- 19) M. Imaoka and T. Yamazaki, "Handbook of Glass Data, Part C:
Ternary Silicate Glasses", edited by O. V Mazurin, M. V Streltsina
and T P Shvaiko-Shvaikovskaya, (Elsevier, Amsterdam, 1987) p. 721.
- 20) J. Gamble. "Chemical Anatomy, Physiology and Pathology of
Extracellular Fluid", 6 ed. (Harvard University Press, Cambridge,

- 1967) p. 1.
- 21) C. Ohtsuki, H. Kushitani, T Kokubo, S. Kotani and T Yamamuro, J. Biomed. Mater. Res., submitted.
- 22) T. Kokubo, J Non-Cryst. Solid, 120 (1990) 138-151
- 23) T. Kokubo, "CRC Handbook of Bioactive Ceramics", Vol. I, edited by T. Yamamuro, L. L. Hench and J. Wilson (CRC Press, Boca Raton, 1990) p. 41.
- 24) W. Neuman and M. Neuman, "The Chemical Dynamics of Bone Mineral", (University of Chicago, Chicago, 1958) p. 34.
- 25) A. Paul, J. Mater Sci., 12 (1977) 2246.

表 1 擬似体液及びヒトの血漿のイオン濃度。

	Ion concentration (mM)	
	Simulated fluid	Blood plasma
Na^+	142.0	142.0
K^+	5.0	5.0
Mg^{2+}	1.5	1.5
Ca^{2+}	2.5	2.5
Cl^-	147.8	103.0
HCO_3^-	4.2	27.0
HPO_4^{2-}	1.0	1.0
SO_4^{2-}	0.5	0.5

表 2 実験に用いたいくつかのガラスの組成。

Name	Composition (mol%)		
	CaO	SiO ₂	Al ₂ O ₃
Ca60Al40	60.0	0	40.0
Ca50Si25Al25	50.0	25.0	25.0
Ca50Si45Al5	50.0	45.0	5.0
Ca49Si49Al2	49.0	49.0	2.0
Ca49.5Si49.5Al1	49.5	49.5	1.0
Ca50Si50	50.0	50.0	0

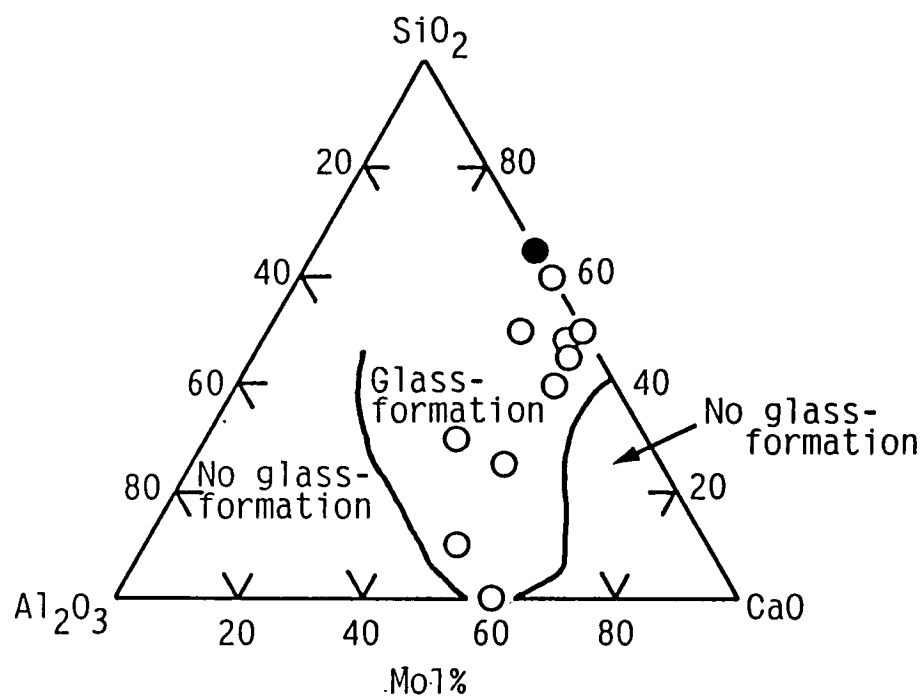


図 1 実験に用いた $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラスの組成とその外観。ガラス形成域はImaokaら¹⁹⁾により報告されている。
○：透明なガラスを形成，●：不透明なガラスを形成。

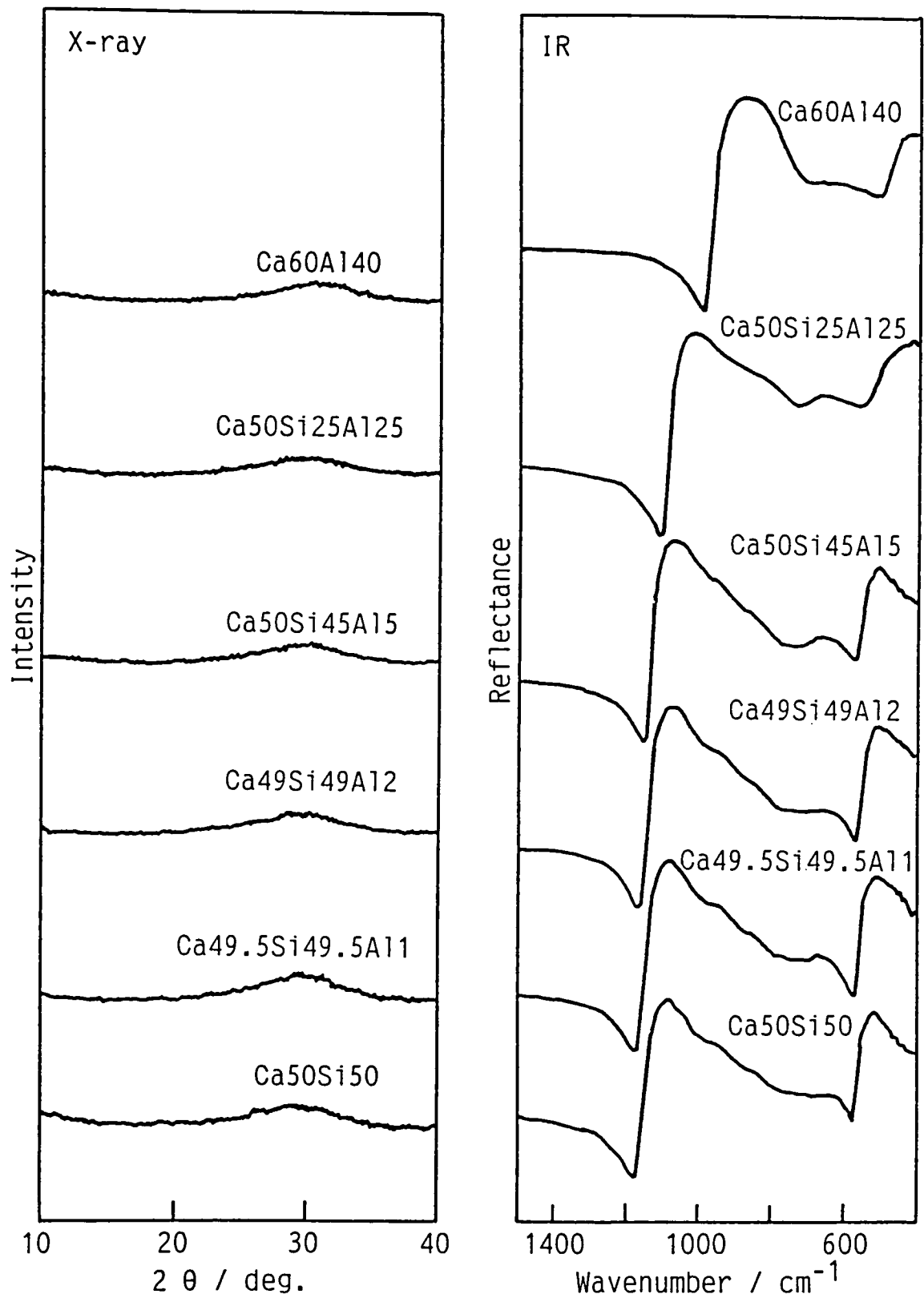


図2 擬似体液浸漬前のいくつかのCaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラス表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトル。

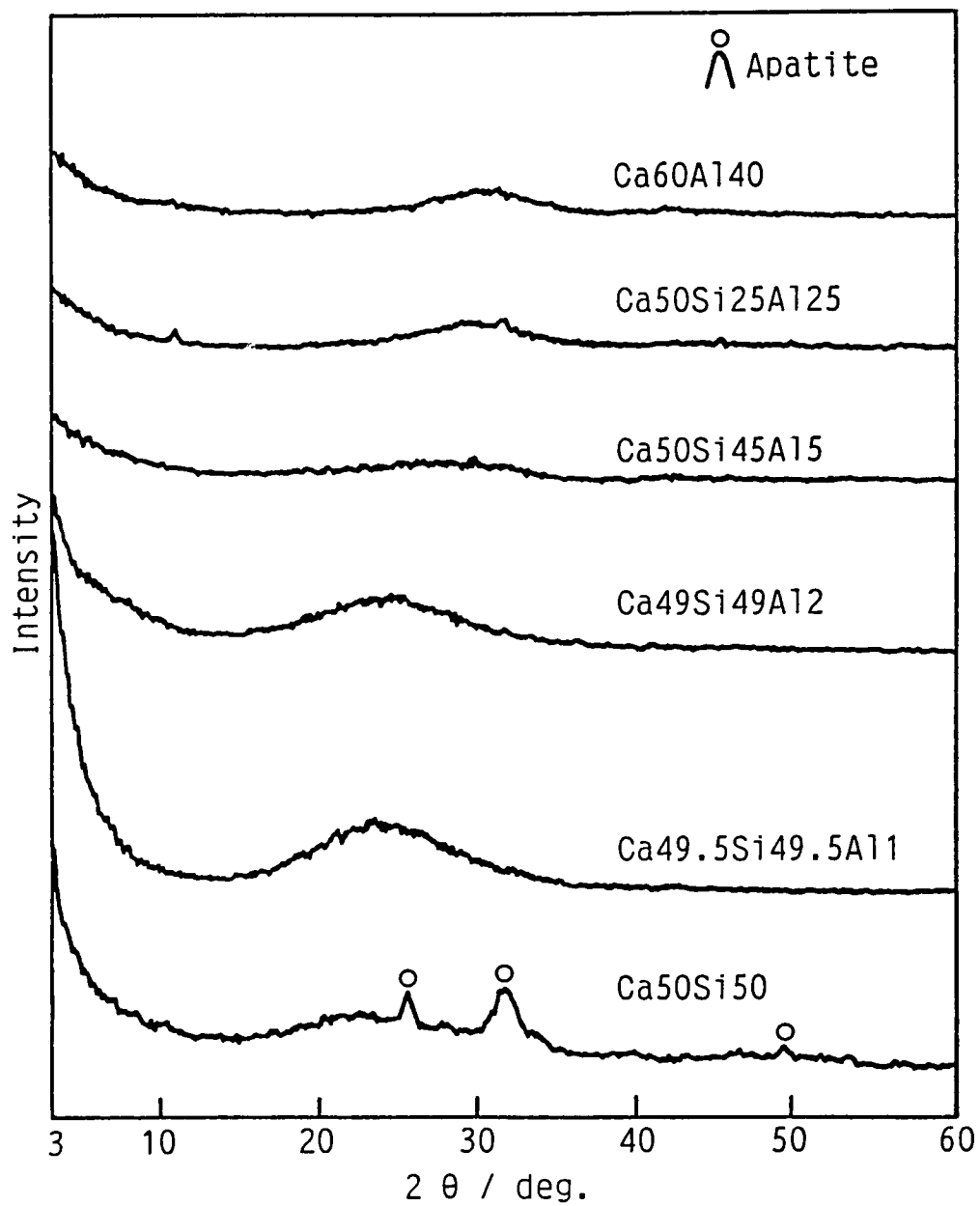


図3 擬似体液に7日間浸漬したいくつかのCaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラス表面の薄膜X線回折図。

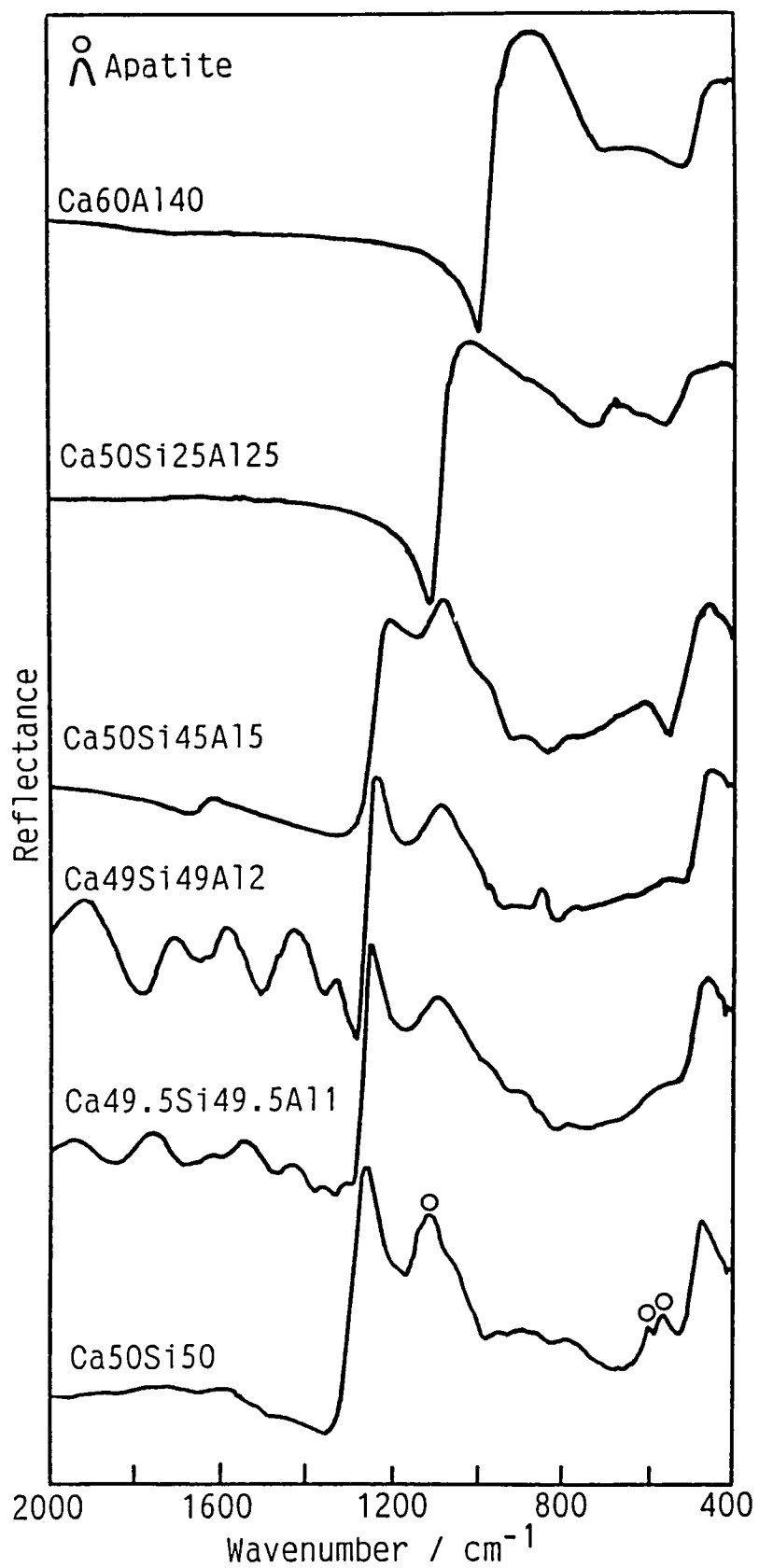


図 4 擬似体液に7日間浸漬したいくつかの $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラス表面のフーリエ変換赤外反射スペクトル。

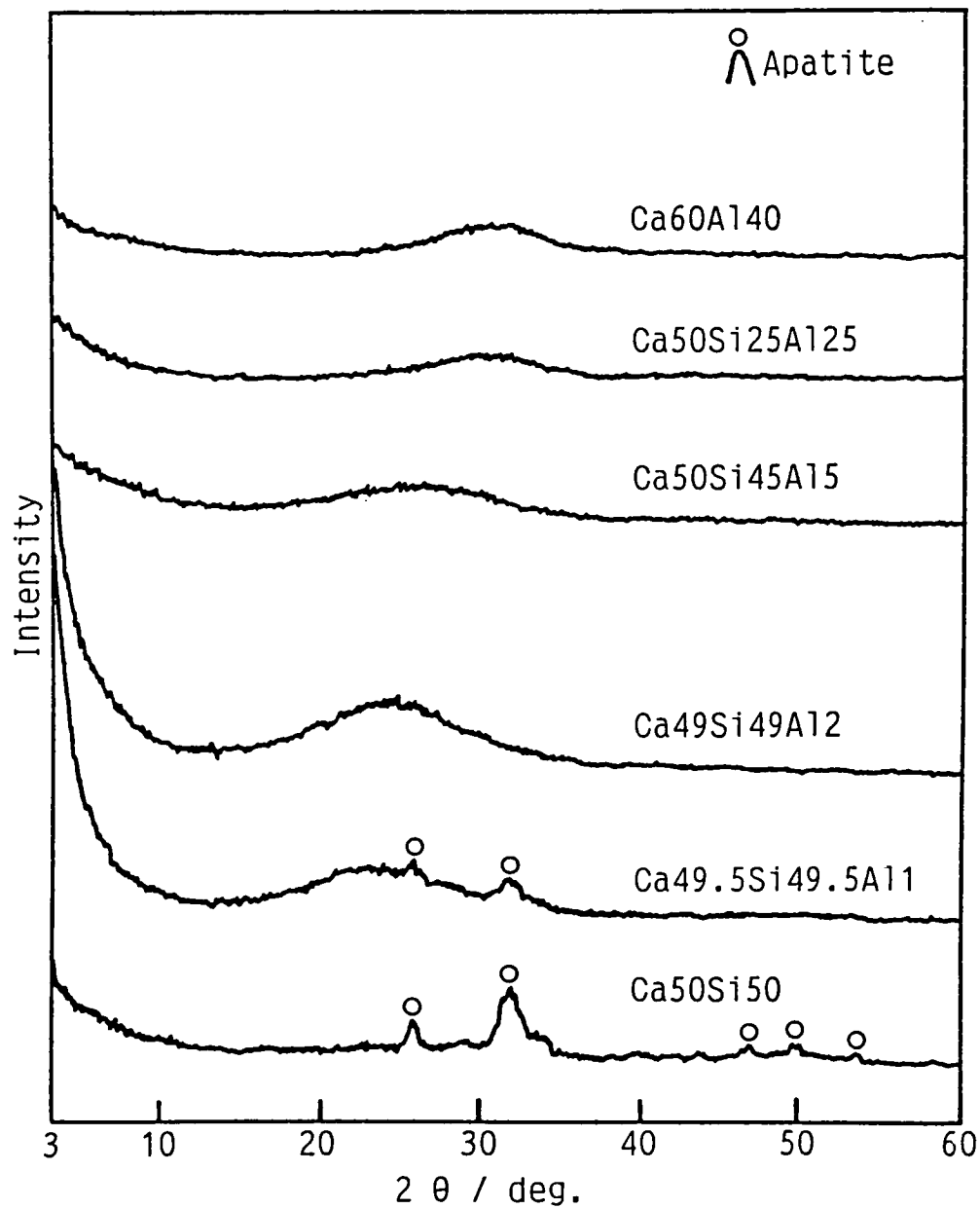


図5 擬似体液に20日間浸漬したいくつかのCaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラス表面の薄膜X線回折図。

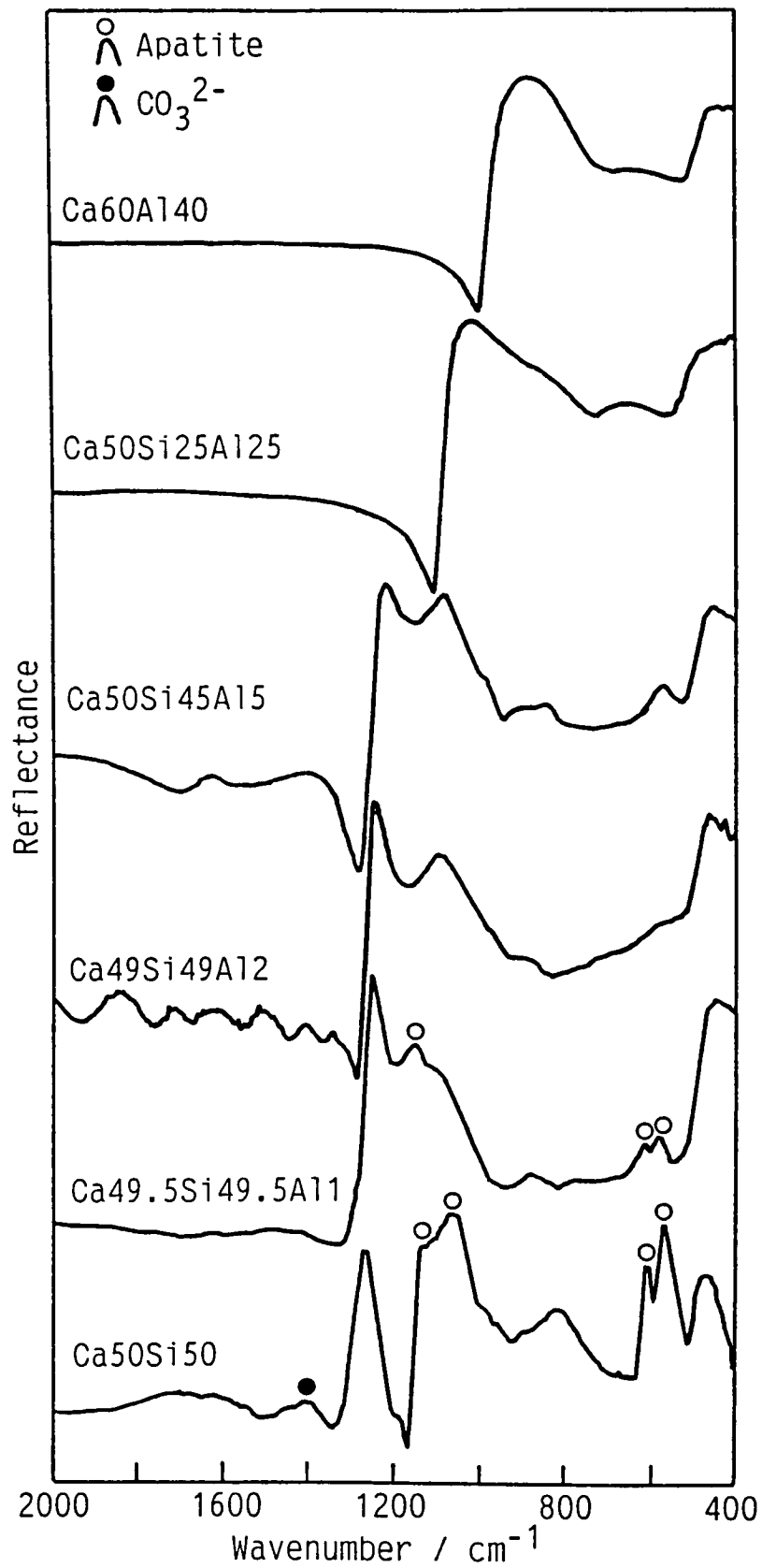


図 6. 擬似体液に20日間浸漬したいくつかのCaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラス表面のフーリエ変換赤外反射スペクトル。

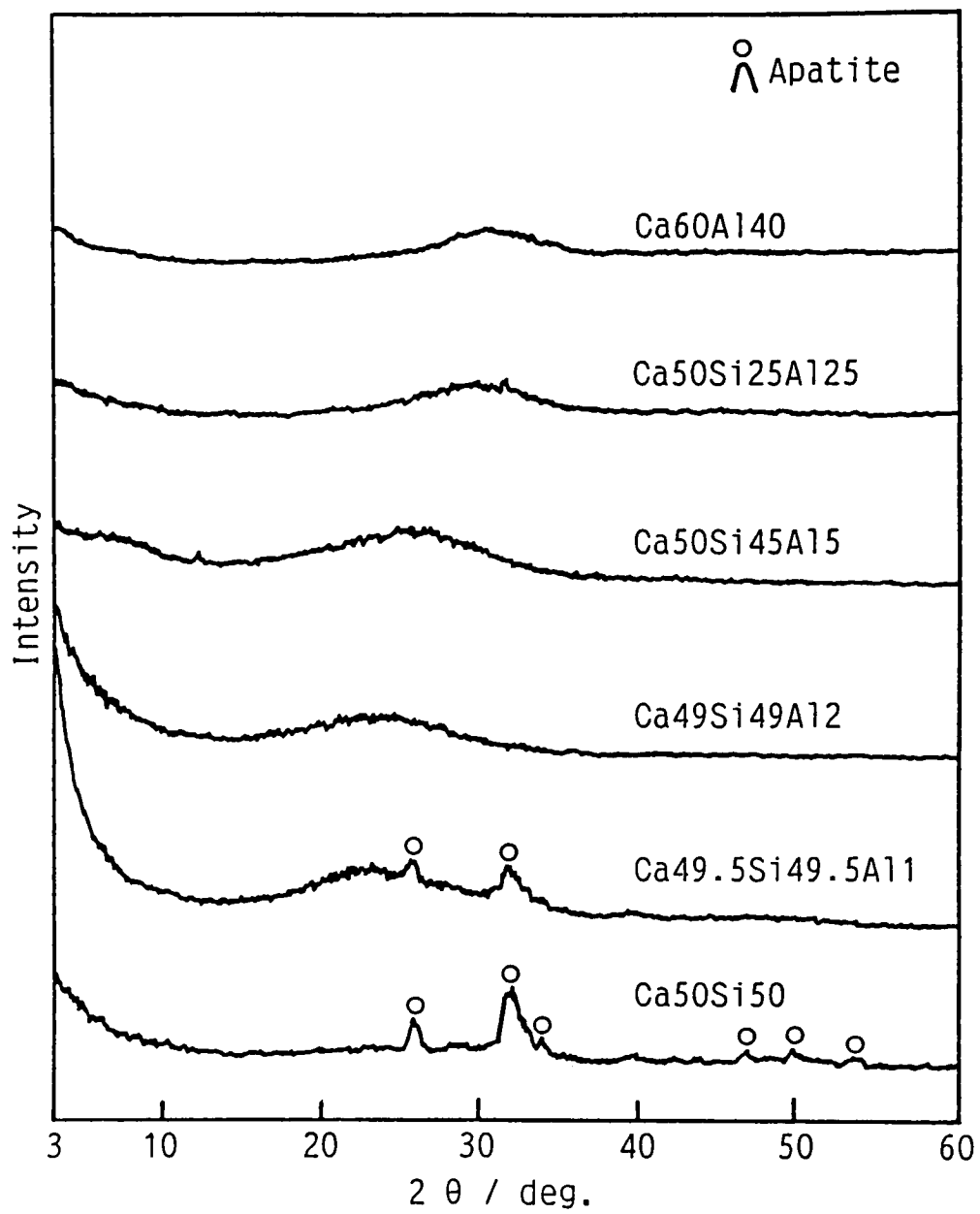


図 7 擬似体液に30日間浸漬したいくつかのCaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラス表面の薄膜X線回折図。

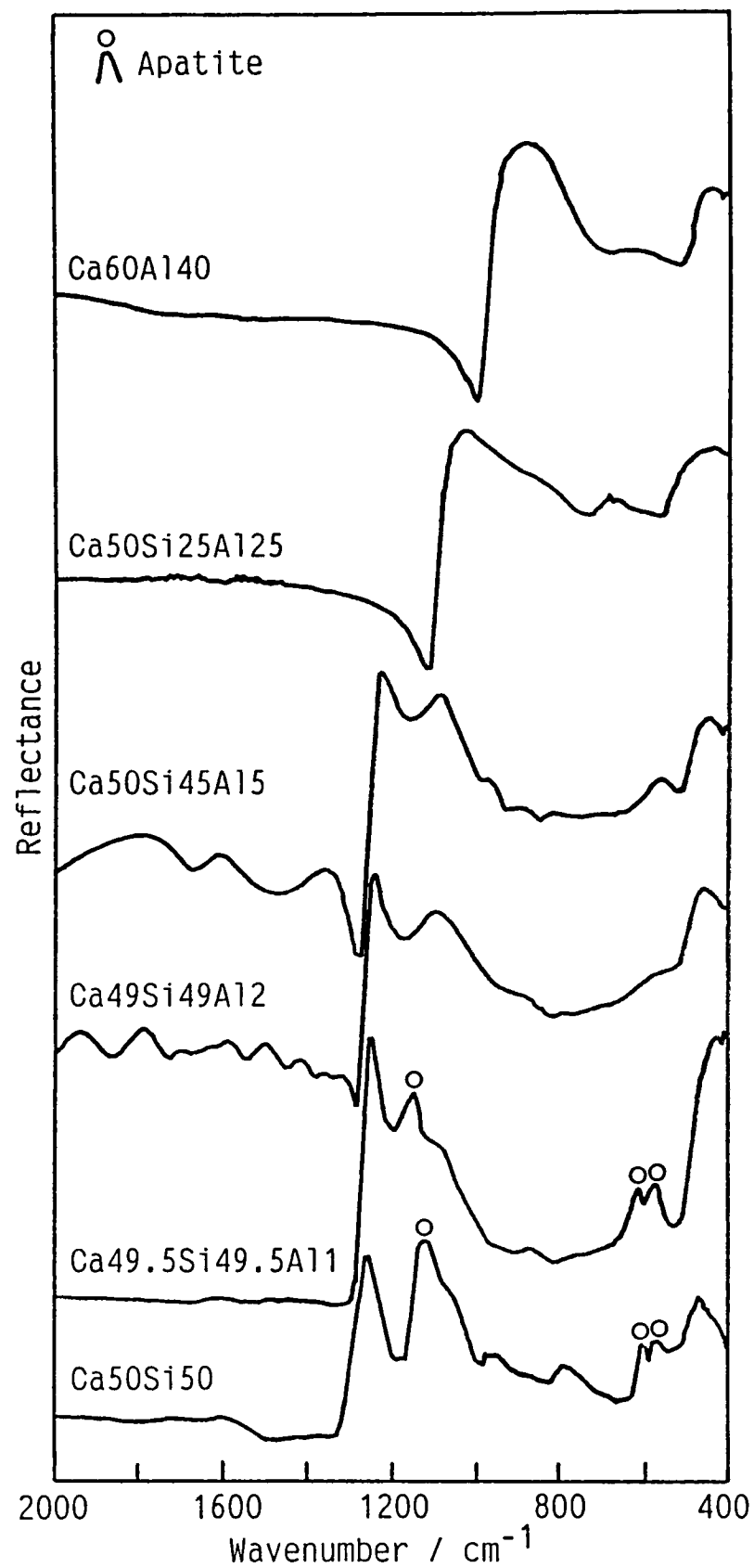


図 8 擬似体液に30日間浸漬したいくつかの $\text{Ca}_0\text{-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系ガラス表面のフーリエ変換赤外反射スペクトル。

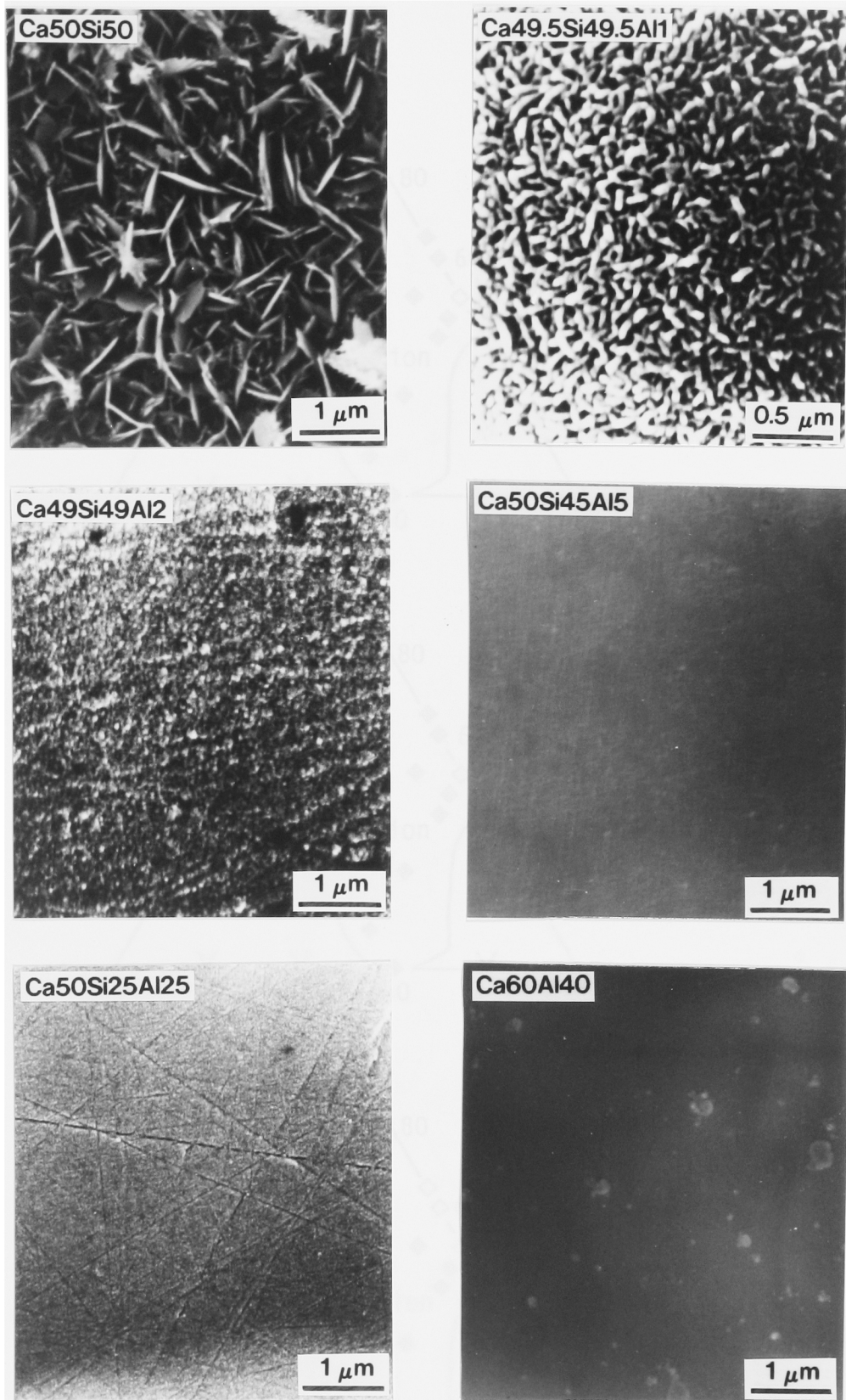


図 9 擬似体液に30日間浸漬したいくつかのCaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラス表面の走査電子顕微鏡写真。

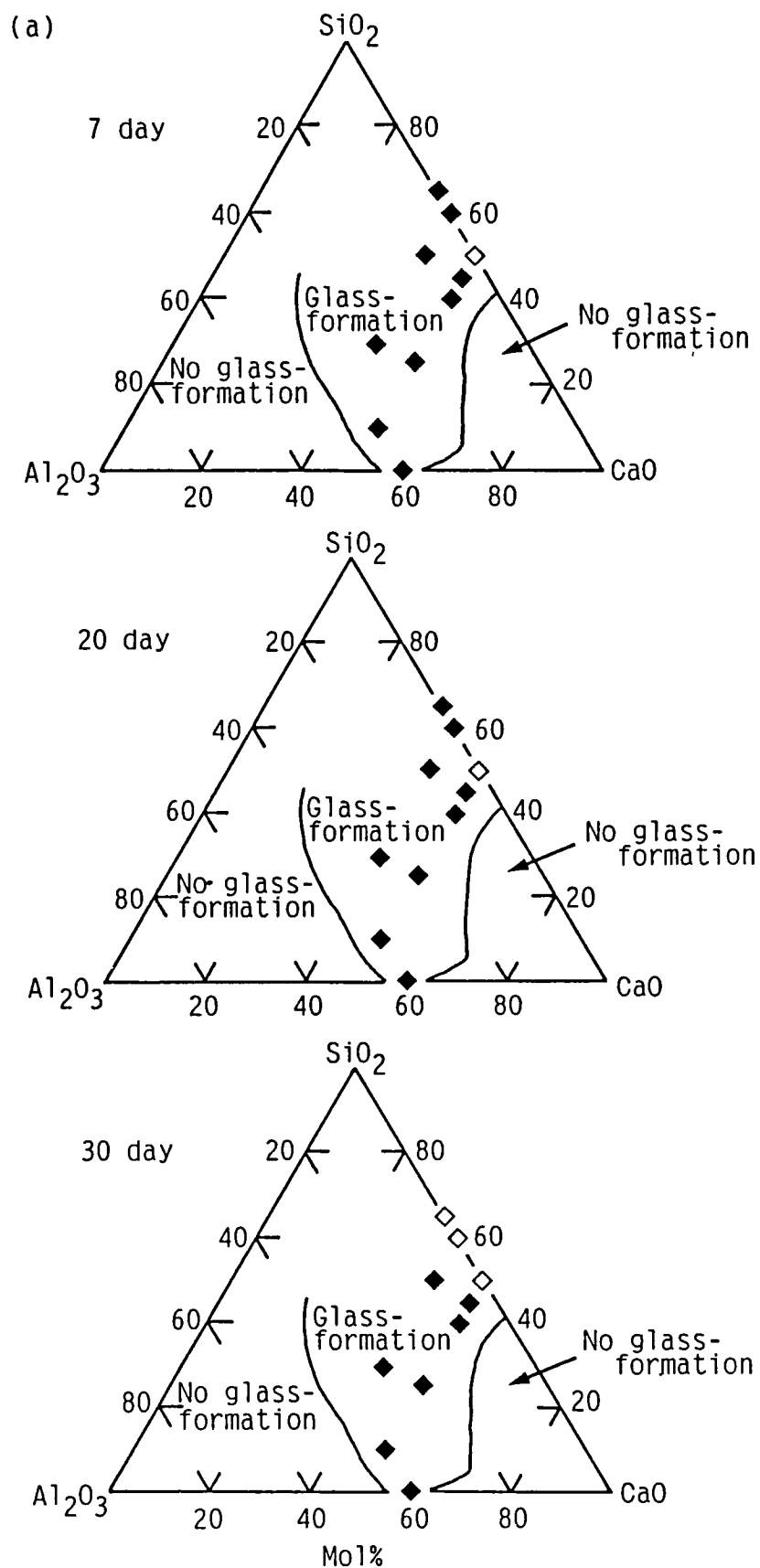


図 10. 擬似体液中におけるCaO-SiO₂-Al₂O₃系ガラス表面でのアパタイト形成の組成依存性。図(b)は図(a)の一部である。
◇: アパタイト形成, ◆: アパタイト形成せず。

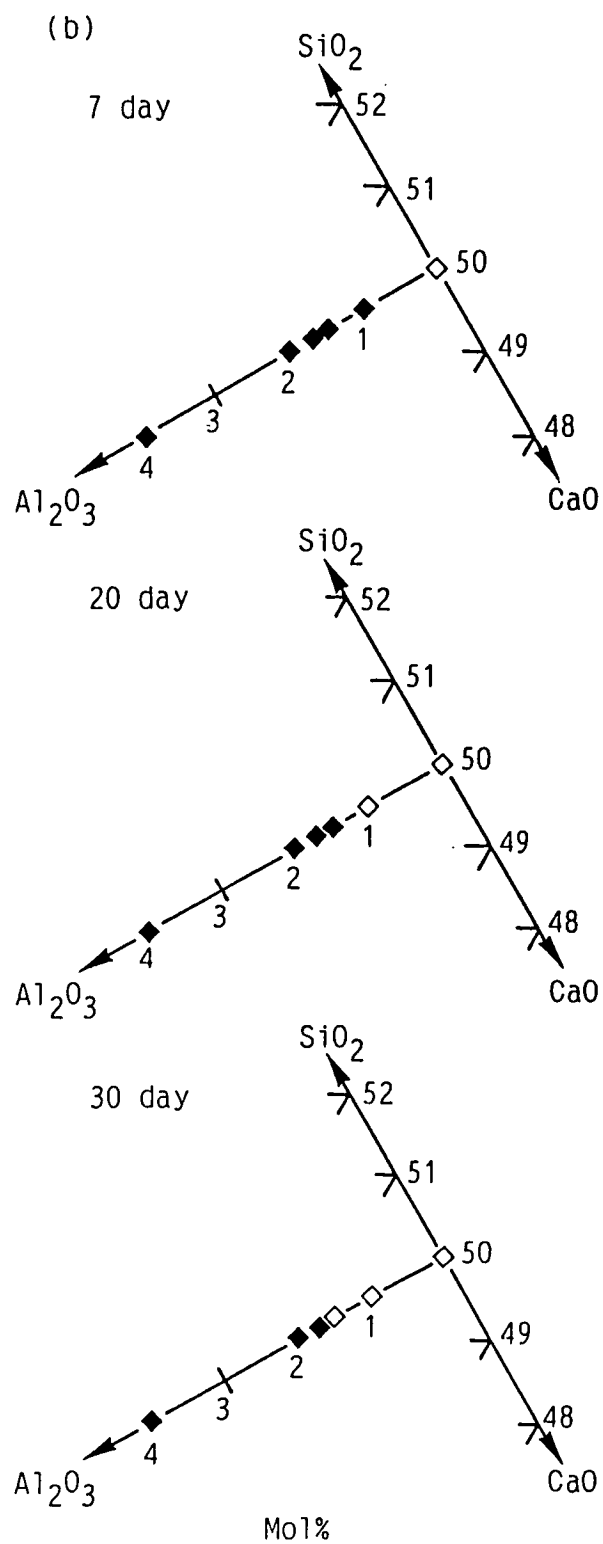


図 10 (続き)

擬似体液中における $\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ 系ガラス表面でのアパタイト生成機構

1 緒言

1972年にHenchらによりBioglassが発見¹⁾されて以来、種々の無機質ガラス²⁻⁴⁾及び結晶化ガラス⁵⁻⁹⁾が生体骨と結合することが明らかにされてきた。それらのうちいくつかは、既に人工耳小骨¹⁰⁾、顎堤維持埋入材^{8,11)}、人工腸骨¹²⁾及び人工椎体^{13,14)}として実用化されている。さらに異なる機能を併せ示す新しい種類の生体活性材料が、ガラスから作られると期待されている。それら新しい種類の生体材料の開発のためには、生体活性を支配する因子の基礎的な理解が必要である。

これまで知られている生体活性な無機質ガラス^{2-4,15,16)}及び結晶化ガラス^{9,17-22)}の大部分は、体内でその表面に骨のアパタイトに類似した炭酸イオン含有水酸アパタイトの層を形成し、同アパタイト層を介して骨と結合することが知られている。このことは、無機質ガラス及び結晶化ガラスが生体骨と結合する必須条件は、体内でその表面に骨類似のアパタイト層を形成することを示している。従って、明らかにされなければならない問題は、ガラスや結晶化ガラス表面でのアパタイト生成機構である。

体液は通常の状態、既にアパタイトに対して過飽和であることが知られている²³⁾。そのような環境下では、いったんガラスや結晶化ガラス表面にアパタイトの核が形成されると、それらの核は周囲の体液からカルシウムとリン酸イオンを

取り込んで自発的に成長する。従って、問題はガラスや結晶化ガラス表面におけるアパタイトの核形成の機構にしばられる。

Kokuboら²⁴⁻²⁶⁾は先に、 MgO-CaO-SiO_2 ガラス相中にアパタイトとウォラストナイトを析出させた結晶化ガラスA-Wについての研究で、体内でその表面にアパタイト層を形成するには、結晶化ガラスから溶出するカルシウムとケイ酸イオンの両者が重要な役割を果たすことを報告している。さらに、彼らは P_2O_5 を含まないガラスを含む CaO と SiO_2 を主成分とするガラスは、*in vitro*³⁾及び*in vivo*²⁷⁾でその表面にアパタイト層を形成するが、 CaO と P_2O_5 を主成分とするガラスは同層を形成しない²⁷⁾ことを明らかにした。これらの結果に基づいて、彼らはガラスや結晶化ガラスから溶出するカルシウムイオンが周囲の体液のアパタイトに対する過飽和度を上げ、水和ケイ酸イオンがそれら表面にアパタイトの核を形成するために有利な位置を与えるものと推定した。アパタイト層形成における水和ケイ酸イオンの重要性については、Henchら²⁸⁾やAnderssonら²⁹⁾によっても、それぞれから指摘されている。しかしながら、アパタイト生成における水和ケイ酸イオンの役割については、詳しくは分かっていない。

本研究では、 CaO と SiO_2 を主成分とするガラス表面でのアパタイトの核形成速度を、 CaO と P_2O_5 を主成分とするガラス表面の場合と対比して、熱力学的駆動力と界面エネルギー障壁から定量的に調べた。これらの結果に基づき、ガラス表面でのアパタイトの核形成におけるカルシウムとケイ酸イオンの役割を、分割して検討した。

2 実験方法

2.1. ガラスの調製

先の研究で報告されているように²⁷⁾、図1に示すCaO-SiO₂-P₂O₅系組成図上の◇で表したCaOとSiO₂を主成分としたガラスは、ヒトの血漿成分とほぼ等しいイオン濃度を有する³⁰⁾擬似体液中で30日以内に、その表面に骨類似のアパタイト層を形成するが、CaOとP₂O₅を主成分とするガラスは同層を形成しない。本研究のために、それぞれの組成から2つの組成のガラスを選んだ。その組成を表1に示す。化学試薬のCaCO₃、SiO₂、CaHPO₄・2H₂O及びH₃PO₄(85%)をそれぞれの組成になるように混合し、その原料粉末40gを50mlの白金るつぽに入れ、MoSi₂炉中で1時間熔融した。熔融温度は、Ca₅₀Si₅₀とCa₅₀Si₄₅P₅ガラスについて1600℃、Ca₅₀Si₅P₄₅ガラスについて1150℃及びCa₅₀P₅₀ガラスについて1050℃とした。融液は室温の鉄板状に流し出し、上から別の鉄板で抑えて、厚さ約1mmの板状のガラスにし、そのガラスをSiC炉中で適当な温度から炉冷した。

2.2. 擬似体液への浸漬

得られたガラスから15×10×1 mm³の大きさの板状試料を切り出し、その表面を3～4μmφのダイヤモンドペーストで研磨し、アセトン及びイオン交換水でこの順に洗浄した後、表2に示す細胞を含まず無機イオン濃度をヒトの血漿成分のそれにほぼ等しくした擬似体液7mlに浸漬した³⁰⁾。擬似体液は、イオン交換水に化学試薬のNaCl、NaHCO₃、KCl、K₂HPO₄、MgCl₂・6H₂O、CaCl₂及びNa₂SO₄を溶かして調製した。液は、緩衝剤としてトリスヒドロキシメチルアミノメタン((CH₂OH)₃CNH₂) 50mMと塩酸(HCl) 45mMを加えて、pHを7.25に保ち、その温度を36.5℃に保った。この擬似体液を用いると、種々の無機質ガラス及び結晶化ガラスについて、生体内における表面でのアパタイト形成を再現できることが確かめられている^{21, 27)}。

2.3. 表面構造の分析

1、3、6、12時間、1、2、3及び7日間擬似体液に浸漬した後に、試料を液から取り出し、アセトンで軽く洗浄した。擬似体液に浸漬された試料の表面を薄膜X線回折及びフーリエ変換赤外反射分光法により調べた。X線回折には、Rigaku CN2 651A2薄膜アタッチメントを用い、X線の試料表面への入射角は1°で行った。赤外分光法には、日本分光FT-IR-5M分光光度計を用い、反射角75°で行った。両者の手法を用いれば、表面の厚さ約1 μ mの層だけの分析が可能になる。

2.4. 元素濃度の測定

擬似体液から試料を取り除いた後に、ガラスの浸漬による液中のカルシウム、ケイ素及びリンの濃度変化を高周波誘導結合プラズマ（ICP）発光分光分析によって調べた。同液のpH変化も測定した。

3 結果

3.1. 表面構造変化

擬似体液に浸漬する前及び種々の期間浸漬した後のCa50Si50、Ca50Si45P5、Ca50Si5P45及びCa50P50ガラス表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトルを図2から5に示す。図2から5には、すでに報告されているデータ^{11, 32, 36, 37)}に基づいた帰属も示した。赤外反射スペクトルの500、1100及び1250 cm^{-1} のピークは、それぞれSi-O変角振動¹¹⁾、Si-O伸縮振動の横分光モード及びSi-O伸縮振動の縦分光モードに帰属される³⁶⁾。同スペクトルの650、920、1120及び1310 cm^{-1} のピークは、それぞれP-O変角振動¹¹⁾、O-P-O伸縮振動、P-O⁻伸縮振動及びP=O伸縮振動に帰属される³⁷⁾。図2から、Ca50Si50ガラスについて、最初の1日でX線回折の低角度の散乱の強度と赤外反射分光スペクトルの1250 cm^{-1} のピークの強度が増加することが分かる。これは、同ガラス表面に先ず水和ケイ酸ゲルが生成することを示している。この期間において、赤外反射スペクトルの650 cm^{-1} のピークの強度が増加する。これは、リン酸カルシウムのようなある種の非晶質のリン酸塩が水和ケイ酸ゲル層の表面に生成したことを示している。図2に示すX線回折と赤外反射スペクトルから、2日でアパタイト層を形成し、同層は浸漬時間に伴い成長することが分かる。

図3から、少量のP₂O₅を含むCaO-SiO₂系ガラスの表面構造変化は、P₂O₅を含まないCaO-SiO₂の表面構造変化と本質的には同じであるが、その速度は後者よりも前者の方が大きいことが分かる。P₂O₅を含むCaO-SiO₂系ガラスについては、表面アパタイトは6時間までに生成する。この場合、図3の赤外反射スペクトルから、表面アパタイトは、骨のアパタイトと同様に炭酸イオンを含んでいることが確かめられる。

CaOとSiO₂を主成分とするガラスに対して、SiO₂を含まないCaO-P₂O₅系ガラス及

び少量の SiO_2 を含む $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ 系ガラスは、擬似体液中で著しい表面構造変化は示さない（図4及び5）。 CaO と P_2O_5 を主成分とするガラスについては、7日間浸漬後も表面アパタイトを形成しない。

3.2. 元素濃度変化

Ca50Si50 、 Ca50Si45P5 、 Ca50Si5P45 及び Ca50P50 ガラスの浸漬による擬似体液のカルシウム、ケイ素及びリンの濃度変化とpHの変化を図6から9に示す。図6及び7から、 CaO と SiO_2 を主成分とするガラスは、カルシウム及びケイ素濃度の著しい増加と、リン濃度の著しい減少を示す。濃度変化の速度は、 P_2O_5 を含まない CaO-SiO_2 系ガラスについてよりも、 P_2O_5 を含む CaO-SiO_2 系ガラスについての方が大きい。カルシウム及びケイ素濃度の増加はガラスからのカルシウム及びケイ酸イオンの溶出により、リン濃度の減少は周囲の液からリン酸イオンを消費し、ガラス表面に非晶質のリン酸塩及び結晶性のアパタイトを形成したことによる。一方、 CaO と P_2O_5 を主成分とするガラスは、カルシウム濃度のわずかな増加とリン濃度の著しい増加を示す（図8及び9）。リン濃度の増加はガラスからのリン酸イオンの溶出による。

4. 考察

上記の結果から、 P_2O_5 を含む $CaO-SiO_2$ 系ガラスは擬似体液中において、最も速くその表面にアパタイト層を形成し、 P_2O_5 を含まない $CaO-SiO_2$ 系ガラスも同層を形成するが、 CaO と P_2O_5 を主成分とするガラスは、7日浸漬後も同層を形成しないことが分かる。

上述のように、体液は通常の状態でもアパタイトに対して既に過飽和である。従って、いったんアパタイトの核が生成すると、それらは周囲の液からカルシウムとリン酸イオンを取り込んで自発的に成長する。これらのことより、擬似体液中におけるガラス表面でのアパタイトの核形成速度は、 CaO と P_2O_5 を主成分とするガラス < P_2O_5 を含まない $CaO-SiO_2$ 系ガラス < P_2O_5 を含む $CaO-SiO_2$ 系ガラスの順に増加することが、本研究の結果から分かる。

一般に、温度 T の溶液中における基板上での結晶の核形成速度 I は、以下の式で与えられる³⁸⁾。

$$I = I_0 \exp\left(\frac{-\Delta G^*}{kT}\right) \exp\left(\frac{-\Delta G_m}{kT}\right) \quad (1)$$

ここで、 ΔG^* は臨界径のエンブリオの形成のための自由エネルギー、 ΔG_m は分子が核と周囲の溶液の界面をよぎって移動するための活性化エネルギーである。これらのうち、 ΔG_m は基板に依存しない。 ΔG^* は次式で与えられる。

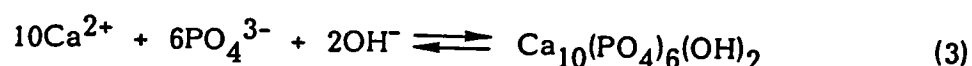
$$\Delta G^* = \frac{16 \sigma^3 f(\theta)}{3(kT/V_\beta \ln(IP/K_0))^2} \quad (2)$$

ここで σ は核と溶液間の界面エネルギー、 IP は溶液中での結晶のイオン活動度積、 K_0 は平衡での IP の値、即ち結晶の溶解度積、 $f(\theta)$ は核と基板の間の接触角の関数、

V_g は、結晶相の分子容である。これらのうち、 $f(\theta)$ は基板に依存する。 IP/K_0 、即ち過飽和度の程度は、基板が結晶を構成するいくつかのイオンを溶出する場合には、基板に依存する。一方、他は基板に依存しない。

本実験結果によれば、 CaO と SiO_2 を主成分とするガラスは多量のカルシウムイオンを溶出するが、 CaO と P_2O_5 を主成分とするガラスは多量のリン酸イオンを溶出する。これらイオンの溶出は周囲の体液のアパタイトのイオン活動度積 IP の変化の原因となる。

擬似体液中における構成イオンからの水酸アパタイトの形成は、次式により与えられる。



従って、液中のアパタイトのイオン活動度積 IP は次式で与えられる。

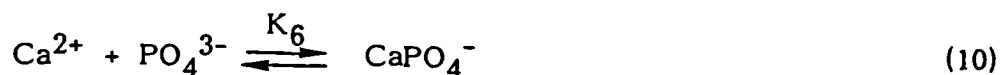
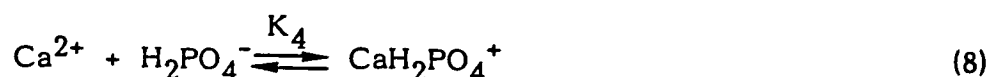
$$\begin{aligned} IP &= (a_{Ca^{2+}})^{10}(a_{PO_4^{3-}})^6(a_{OH^-})^2 \\ &= (\gamma_{Ca^{2+}})^{10}(\gamma_{PO_4^{3-}})^6(\gamma_{OH^-})^2[Ca^{2+}]^{10}[PO_4^{3-}]^6[OH^-]^2 \end{aligned} \quad (4)$$

ここで、 a は活動度、 γ は活動度係数、 $[]$ はそれぞれのイオンの濃度である。Neumanら³⁹⁾によれば、生理的イオン強度 ($\mu=0.16$) で、 $\gamma_{Ca^{2+}}$ 、 $\gamma_{PO_4^{3-}}$ 及び γ_{OH^-} はそれぞれ、0.36、0.06及び0.72である。式(4)に $\gamma_{Ca^{2+}}$ 、 $\gamma_{PO_4^{3-}}$ 及び γ_{OH^-} を代入し、図6から9に示したの元素濃度やpHから、ガラスからのイオンの溶出による擬似体液のアパタイトに対するイオン活動度積の変化が計算できる。これらの計算においては、 H_3PO_4 、 $H_2PO_4^-$ 、 HP_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 及び H^+ の間に以下の平衡が成り

立っていると仮定できる。



ここで、 K_1 、 K_2 及び K_3 は37℃で、それぞれ 6.22×10^{-3} 、 6.58×10^{-8} 及び 6.61×10^{-13} である⁴⁰⁻⁴²⁾。Neumanにれば、活動度係数 γ_{H^+} 、 $\gamma_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}$ 及び $\gamma_{\text{HPO}_4^{2-}}$ は、それぞれ0.81、0.61及び0.23である。さらに、 Ca^{2+} 、 H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 及び PO_4^{3-} イオンの間に以下の平衡が成り立っていると仮定した。



ここで、 K_4 、 K_5 及び K_6 は37℃で、それぞれ31.9、 6.81×10^2 及び 3.46×10^6 である⁴³⁾。活動度係数 $\gamma_{\text{CaH}_2\text{PO}_4^+}$ 及び $\gamma_{\text{CaPO}_4^-}$ は報告されていないので、Debye-Hückelの近似式

$$\log \gamma_i = \frac{-0.5Z_i^2 \sqrt{\mu}}{1 + \sqrt{\mu}} \quad (11)$$

によりそれぞれ0.72及び0.72とした。ここで γ_i は、 Z_i 価のイオン種 i の活動度積である。

ガラスの浸漬による擬似体液のアパタイトに対するイオン活動度積の変化を図10に示す。水溶液中におけるアパタイトの溶解度積 K_0 は37℃で、 5.5×10^{-118} と報告されている⁴⁴⁾。従って、擬似体液中のアパタイトの過飽和度 IP/K_0 の程度は、ガラスを擬似体液に浸漬する前でさえ、1よりもかなり高い。この値は、ガラス浸漬に伴い、さらに増加する。しかし、図10から、ガラスを浸漬した後12時間までは、CaOとSiO₂を主成分とするガラスについての液の過飽和度の上昇の程度は、CaOとP₂O₅を主成分としたガラスについての上昇の程度と、ほぼ同じであることが分かる。このことは、CaOとSiO₂を主成分とするガラス表面におけるアパタイト核形成の速度がより高いのは、カルシウムイオンの溶出による過飽和度の程度の上昇がより大きいことによるのではなく、 $f(\theta)$ がより小さいことによることを意味している。一般に $f(\theta)$ 項は式(12)で与えられ、結晶と基板の界面エネルギーの低下に伴って減少する。

$$f(\theta) = \frac{(2+\cos \theta)(1-\cos \theta)^2}{4} \quad (12)$$

このことは、CaOとSiO₂を主成分とするガラスは、アパタイトに対して低い界面エネルギーを持つ特別な表面を与えていることを示している。図2及び3から、CaOとSiO₂を主成分とするガラスはアパタイト層の形成の前に水和ケイ酸ゲル層を形成するが、CaOとP₂O₅を主成分とするガラスは、同ゲル層を形成しないことが分かる。このことから、擬似体液中でガラス表面に生成した水和シリカが、アパタイトの核形成に対して、特定の有利な位置を与えていると結論できる。

図10において、CaOとSiO₂を主成分とするガラスについて、時間が長くなった場合に擬似体液のアパタイトに対するイオン活動度積が低下するのは、液からカルシウム及びリン酸イオンを取り込んで、これらガラス表面においてアパタイトの

核を形成し、この核が結晶成長したことによる。図10において、 P_2O_5 を含まない $CaO-SiO_2$ 系ガラスよりも P_2O_5 を含む $CaO-SiO_2$ 系ガラスのほうがより低い過飽和度でアパタイトを形成することは興味深い。これは、 P_2O_5 を含む $CaO-SiO_2$ 系ガラスの表面での水和ケイ酸ゲルの形成が、 P_2O_5 を含まない $CaO-SiO_2$ 系ガラスよりも速いことによると考えられる。前者のガラス表面での水和ケイ酸ゲルの生成がより速いことは、同ガラスからのケイ酸イオンの溶出（図7）が、後者のガラスより（図6）も速いことから分かる。従って、 P_2O_5 を含む $CaO-SiO_2$ 系ガラスの表面におけるアパタイトの核形成は、より低い過飽和度でも水和シリカによって効果的に誘起される。

以上の結果から、 CaO と SiO_2 を主成分とするガラスから溶け出したカルシウムイオンは周囲の体液のアパタイトに対する過飽和度を高め、その表面に形成される水和シリカはアパタイトの核形成に特定の有利な位置をことが分かる。その結果、アパタイトの核は CaO と SiO_2 を主成分とするガラス表面に容易に形成され、周囲の液から、カルシウムとリンを取り込み自発的に成長する。以上のことから、異なる機能を併せ示す種々の生体活性な材料は、 CaO と SiO_2 を主成分とするガラスから開発されることが考えられる。

5 総括

種々の無機質ガラス及び結晶化ガラスについて、それらが骨と結合するための必須条件は、体内でその表面にアパタイト層を形成することであることが知られている。 CaO と SiO_2 を主成分とするガラスは擬似体液中で表面アパタイト層を形成するが、 CaO と P_2O_5 を主成分とするガラスは同層を形成しない。このことは前者のガラス表面でのアパタイトの核形成速度が、後者のガラス表面での速度よりも大きいことを示している。 CaO と SiO_2 を主成分とするガラスから溶出するカルシウムイオンによる周囲の体液のアパタイトに対する過飽和度の上昇は、 CaO と P_2O_5 を主成分とするガラスから溶出するリン酸による上昇とほぼ同程度であった。従って、前者のガラス表面でのアパタイト核形成の速度が大きいのは、アパタイトとガラス表面の間の界面エネルギーが低いことによる。 CaO と SiO_2 を主成分とするガラスは、アパタイト層の形成の前に、表面に水和ケイ酸ゲルを形成する。このことから、水和シリカがアパタイトの核形成に特定の有利な位置を与えていることが明かとなった。

参考文献

- 1) L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen and T. K. Greenlee, J. Biomed. Mater. Res. Symp., No. 2 (part 1) (1972) p. 117
- 2) T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura and T. Kokubo, J. Biomed. Mater. Res., 23 (1989) 631.
- 3) K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, Y. Ebisawa, Y. Kotoura and M. Oka, J. Biomed. Mater. Res., 25 (1991) 357.
- 4) K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, Y. Ebisawa, T. Kokubo, Y. Kotoura and M. Oka, J. Mater. Sci.: Materials in Medicine, in press.
- 5) B. A. Blencke, H. Brömer and K. Deutscher, Med. Orthop. Tech., 95, (1975) 144.
- 6) T. Kokubo, M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro and S. Higashi, Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., 60, (1982) 260.
- 7) W. Höland, K. Naumann, W. Vogel and J. Gummel, Wiss. Z. Friedrich-Schiller-Univ. Jena, math.-nat. Reihe, 32, (1983) 571.
- 8) G. Berger, R. Sauer, G. Steinborn, F. G. Wihsmann, V. Thieme, St. Kohler and H. Dressel, "Proceedings of XV Internl. Congress on Glass", Vol. 3a, ed. by O. V. Mazurin (Nauka, Leningrad, 1989) p. 120.
- 9) K. Ohura, M. Ikenaga, T. Nakamura, T. Yamamuro, Y. Ebisawa, T. Kokubo, Y. Kotoura and M. Oka, J. Appl. Biomater., 2 (1991) 153.
- 10) J. Wilson, "Glass-Current Issues", eds. A. F. Wright and J. Dupuy, (Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1985) p. 662.
- 11) L. L. Hench, J. Am. Ceram. Soc., 74 (1991) 1487

- 12) T. Yamamuro, J. Shikata, H. Okumura, S. Yoshii, S. Kotani and T. Kokubo, "Bioceramics", Vol. 2, ed. by G. Heimke (German Ceramic Society. Cologne, 1990) p. 361.
- 13) T. Yamamuro, J. Shikata, H. Okumura, T. Kitsugi, Y. Kakutani, T. Matsui and T. Kokubo, J. Bone and Joint Surg., 72-B (1990) 889.
- 14) V. J. Gummel, H. Zippel and H. Hahnel, Z. Klin. Med., 43 (1988) 1791.
- 15) L. L. Hench and A. E. Clark, "Biocompatibility of Orthopaedic Implants", Vol. II, eds. D. F. Williams (CRC Press, Boca Raton, 1982) p. 129.
- 16) K. H. Karlsson, K. Froberg and T. Ringbom, J. Non-Cryst. Solids, 112 (1989) 69.
- 17) T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura, S. Higashi, Y. Kakutani, K. Hyakuna, S. Ito, T. Kokubo, M. Takagi and T. Shibuya, J. Biomed. Mater. Res., 20 (1986) 1295.
- 18) T. Kitsugi, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, T. Shibuya and M. Takagi, J. Biomed. Mater. Res., 21 (1987) 1255.
- 19) T. Kokubo, C. Ohtsuki, S. Kotani, T. Kitsugi and T. Yamamuro, "Bioceramics", Vol. 2, ed. by G. Heimke (German Ceramic Society. Cologne, 1990) p. 113.
- 20) M. Neo, S. Kotani, Y. Fujita, T. Nakamura, Y. Bando, M. Yokoyama, C. Ohtsuki and T. Kokubo, "Bioceramics", Vol. 4, ed. by W. Bonfield, G.W. Hastings and K. E. Tanner (Butterworth-Heinemann Ltd, London, 1991)p. 165.
- 21) C. Ohtsuki, H. Kushitani, T. Kokubo, S. Kotani and T. Yamamuro, J. Biomed. Mater. Res., 95 (1991) 1363.

- 22) W. Hölzland, W. Vogel, K. Naumann and J. Gummel, J Biomed. Mater. Res., 19 (1985) 303.
- 23) W. Neuman and M. Neuman, "The Chemical Dynamics of Bone Mineral" (University of Chicago, Chicago, 1958) p. 34.
- 24) T. Kokubo, J. Non-Cryst. Solids, 120 (1990) 138.
- 25) T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka and T. Yamamuro, J Mater Sci.: Materials in Medicine, in press.
- 26) T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka and T. Yamamuro, J. Mater Sci.: Materials in Medicine, in press.
- 27) C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Takatsuka and T. Yamamuro, Nippon Seramikkusu Kyokai Gakujutsu Ronbunshi, 99 (1991) 1.
- 28) L. L. Hench, "CERAMICS : TOWARD THE 21ST CENTURY", ed. by N Soga and S. Kato (The Ceramic Society of Japan, Tokyo, 1991) p. 519.
- 29) O. H. Andersson and K. H. Karlsson, J. Non-Cryst. Solids, 129 (1991) 145.
- 30) J. Gamble, "Chemical Anatomy. Physiology and Pathology of Extracellular Fluid", 6 ed. (Harvard University Press, Cambridge, 1967)p. 1.
- 31) T. Kokubo, T. Hayashi, S. Sakka, T Kitsugi, T Yamamuro, M Takagi and T. Shibuya, "Ceramics in Clinical Applications", ed. P. Vincenzini (Elsevier, Amsterdam, 1987) p. 175.
- 32) T. Kokubo, S. Ito, Z. T Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T Kitsugi and T Yamamuro, J. Biomed. Mater Res., 24 (1990) 331.
- 33) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T Kitsugi and T. Yamamuro, J. Biomed. Mater. Res., 24 (1990) 721.

- 34) Y. Ebisawa, T. Kokubo, K. Ohura and T. Yamamuro, J Mater Sci.:
Materials in Medicine, 1 (1990) 239.
- 35) Y. Ebisawa, T. Kokubo, K. Ohura and T. Yamamuro, J Mater Sci.:
Materials in Medicine, Submitted.
- 36) R. M. Almeida, T. A. Guiton and C. G. Pantano, J Non-Cryst. Solids,
119 (1990) 238.
- 37) R. M. Almeida and J. D. Mackenzie, J Non-Cryst. Solids, 40 (1980)
535.
- 38) W. D. Kingery, H. K. Bowen and D. R. Bowen, "Introduction to
Ceramics", 2nd edition (John Wiley & Sons, New York, 1960) p. 328.
- 39) W. Neuman and M. Neuman, "The Chemical Dynamics of Bone Mineral",
(University of Chicago, Chicago, 1958) p. 3.
- 40) R. G. Bates, J Res. Natl. Bur Stand., 47 (1951) 127
- 41) R. G. Bates and S. F. Acree, J. Res. Natl. Bur Stand., 30 (1943)
129.
- 42) N. Bjerrum and A. Unmack, Kgl. Danske Vidensk Selskab. (Nat. Fys.) 9
(1929) 138.
- 43) A. Chughtai, R. Marshall and G. H. Nancollas, J. Phys. Chem., 72
(1968) 208.
- 44) H. McDowell, T. M. Gregory and W. E. Brown, J. Res. Natl. Bur Stand.,
81A (1977) 273.

表 1 実験に用いたガラスの組成。

Name	Composition (mol%)			
	CaO	SiO ₂	P ₂ O ₅	
Ca50Si50	50.0	50.0	0	
Ca50Si45P5	50.0	45.0	5.0	
Ca50Si5P45	50.0	5.0	45.0	
Ca50P50	50.0	0.0	50.0	

表 2 擬似体液及びヒトの血漿のイオン濃度。

	Ion concentration (mM)	
	Simulated fluid	Blood plasma
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	147.8	103.0
HCO ₃ ⁻	4.2	27.0
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

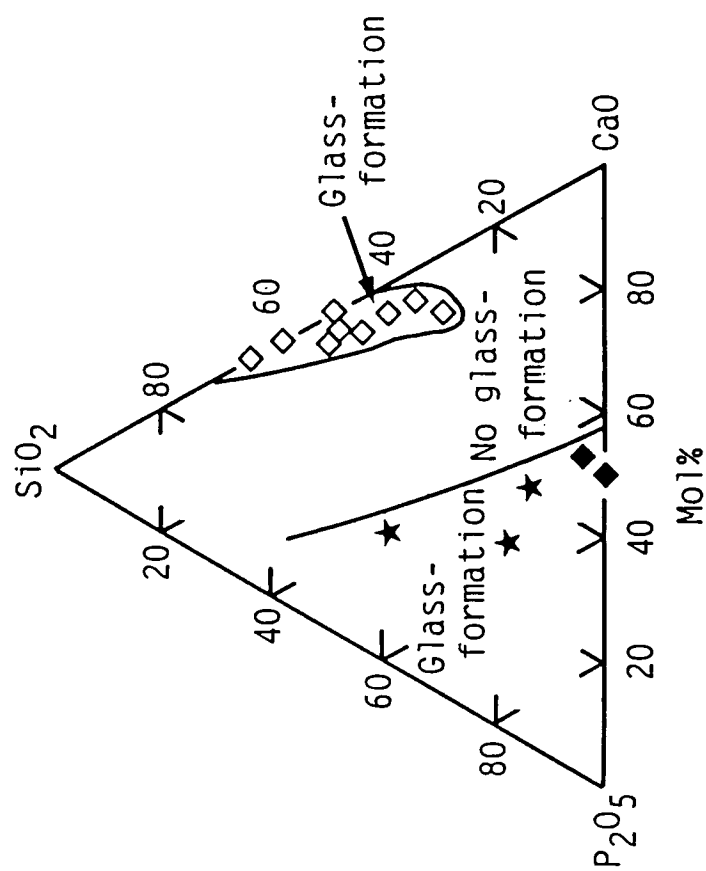


図 1 擬似体液中に30日間浸漬後の $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 系ガラス表面でのアパタイト形成。
◇: アパタイト形成, ◆: アパタイト形成せず, ★: 溶解。

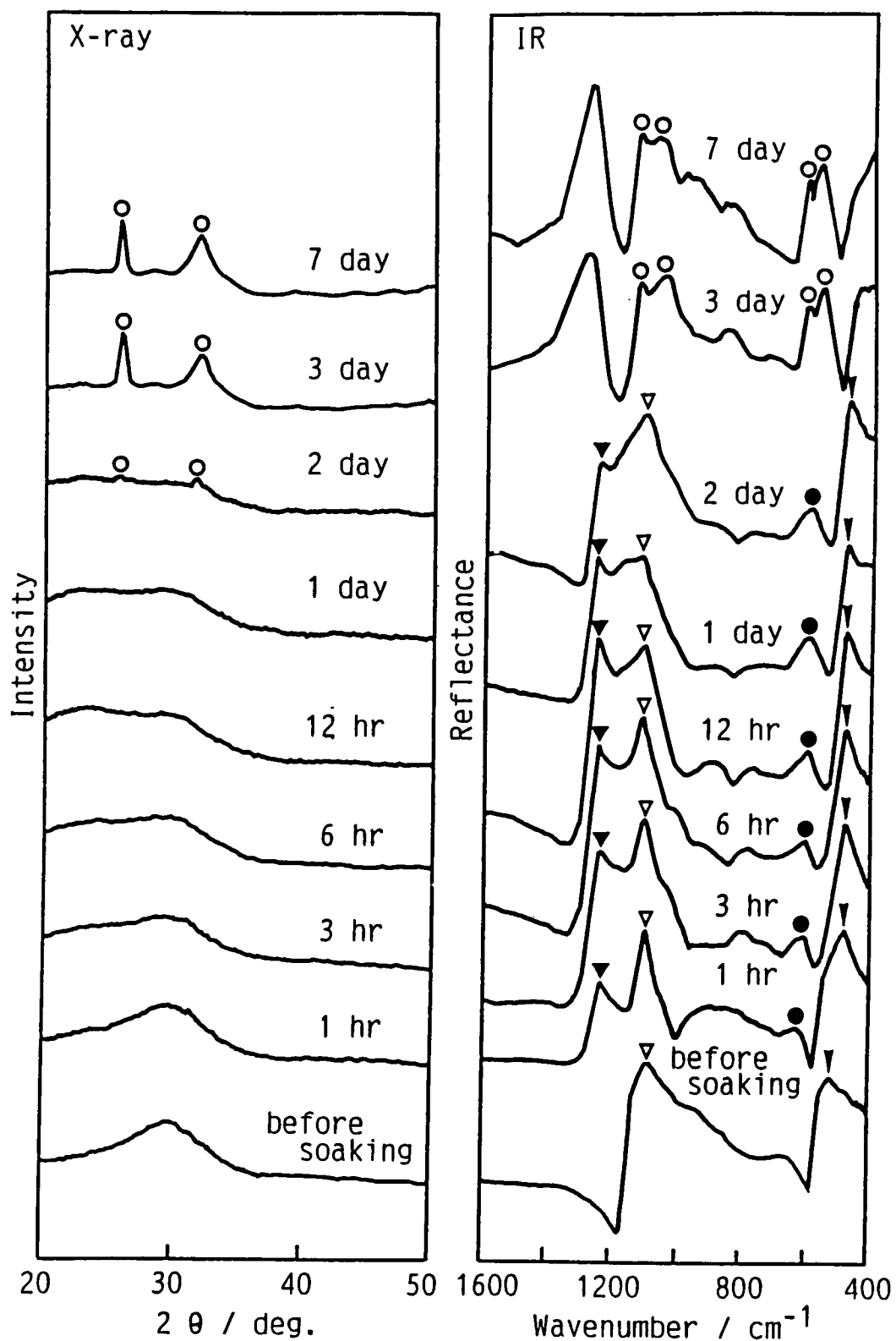


図2. 擬似体液に種々の期間浸漬したCa50Si50ガラス表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトル。
 ○: アパタイト, ▼: Si-O変角振動, ▽: Si-O伸縮振動の横光学モード,
 ▼: Si-O伸縮振動の縦光学モード, ●: P-O変角振動。

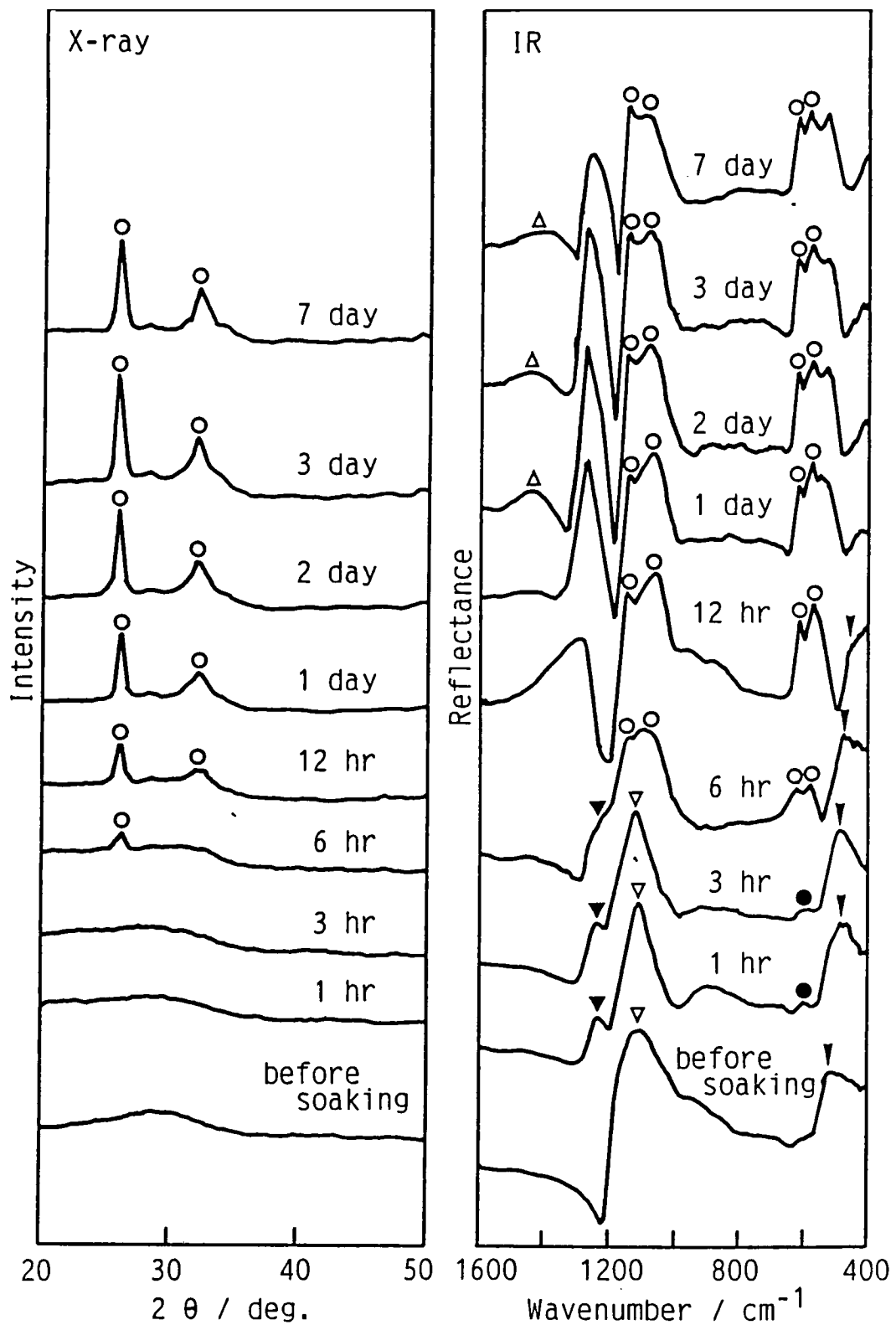


図 3. 擬似体液に種々の期間浸漬したCa₅₀Si₄₅P₅ガラス表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトル。
○: アパタイト, △: CO₃²⁻, ▼: Si-O変角振動, ▽: Si-O伸縮振動の横光学モード, ▴: Si-O伸縮振動の縦光学モード, ●: P-O変角振動。

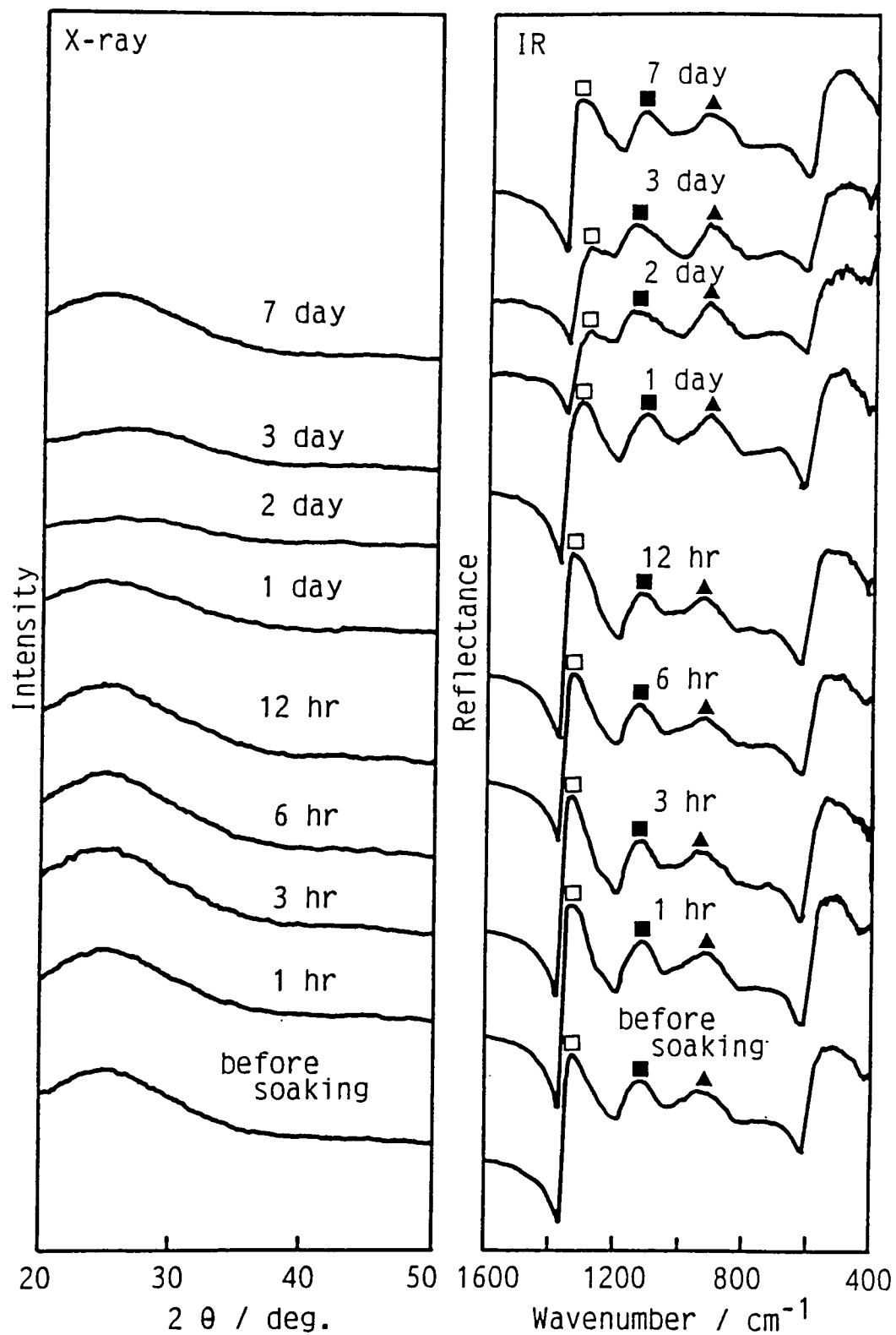


図4 擬似体液に種々の期間浸漬した $\text{Ca}_{50}\text{Si}_{15}\text{P}_{45}$ ガラス表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトル。
□: P=O伸縮振動, ■: P-O⁻伸縮振動, ▲: P-O-P伸縮振動。

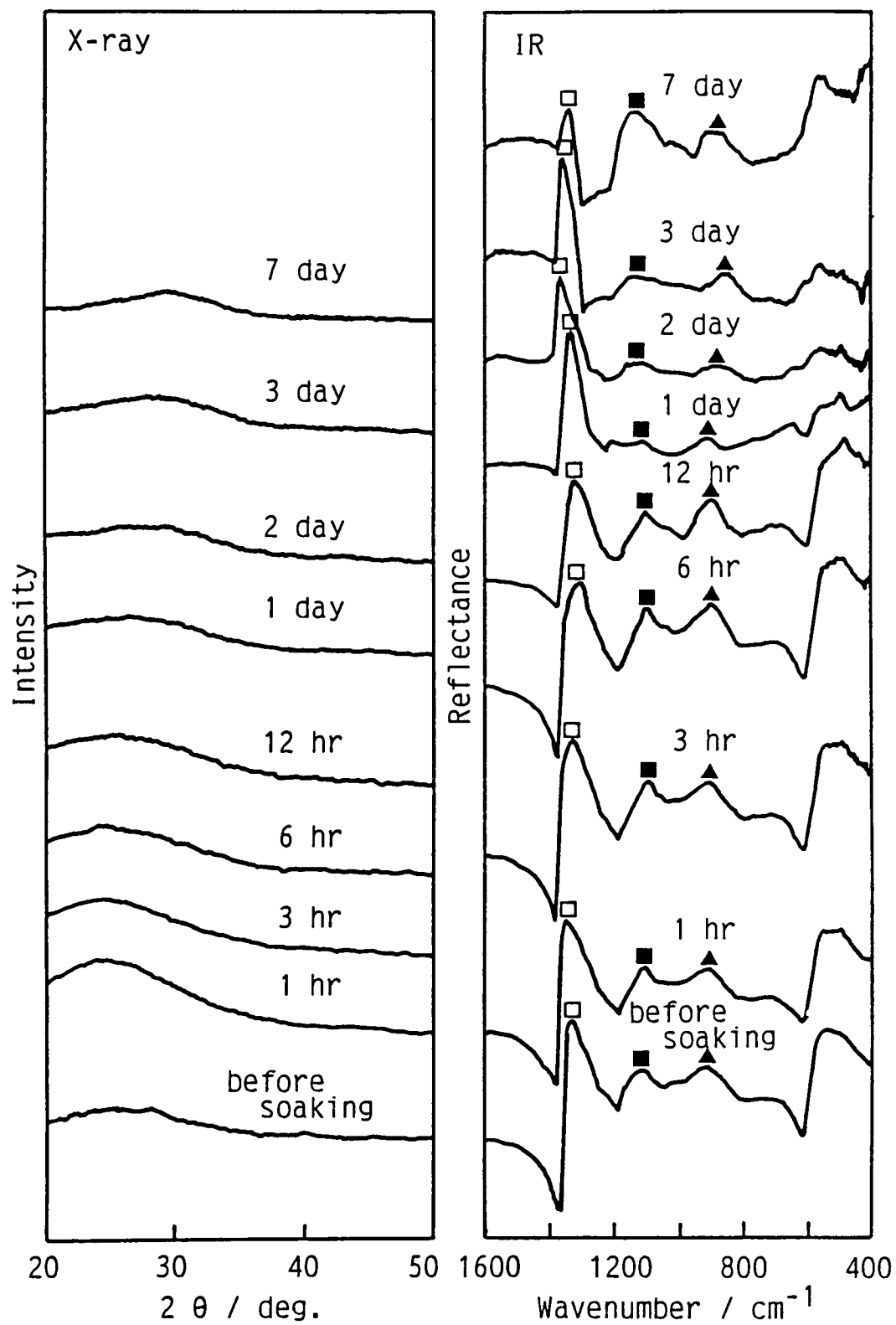


図5 擬似体液に種々の期間浸漬したCa50P50ガラス表面の薄膜X線回折図及びフーリエ変換赤外反射スペクトル。
□: P=O伸縮振動, ■: P-O⁻伸縮振動, ▲: P-O-P伸縮振動。

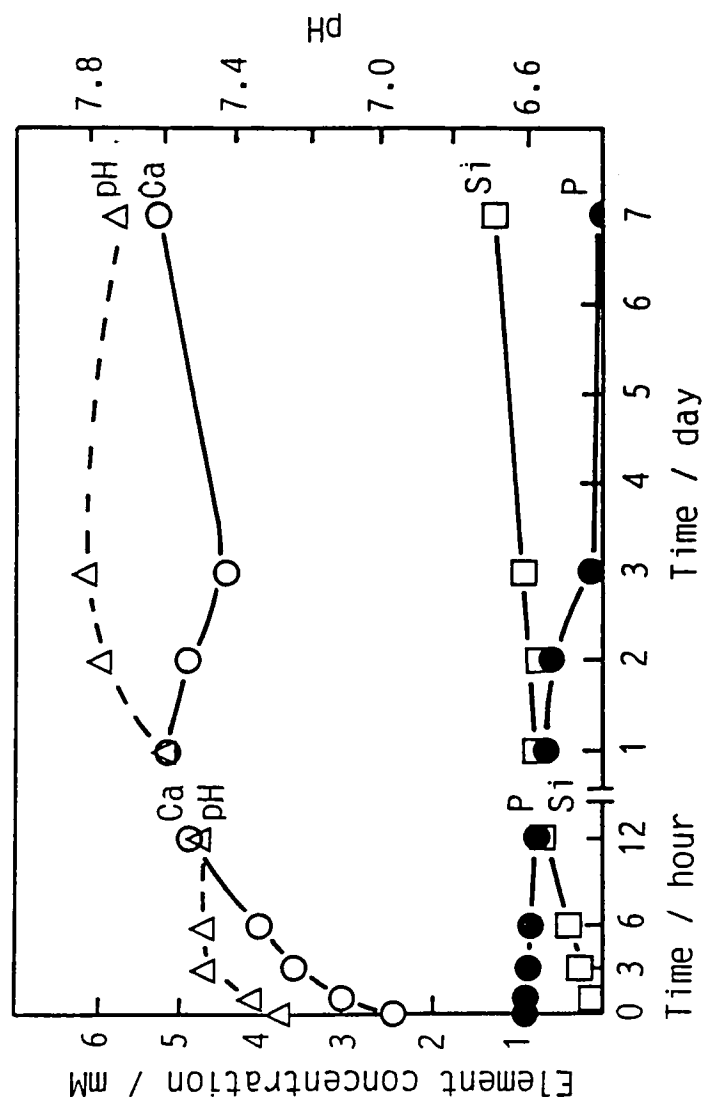


図 6. Ca50Si50ガラスの浸漬による擬似体液の元素濃度及びpHの変化。

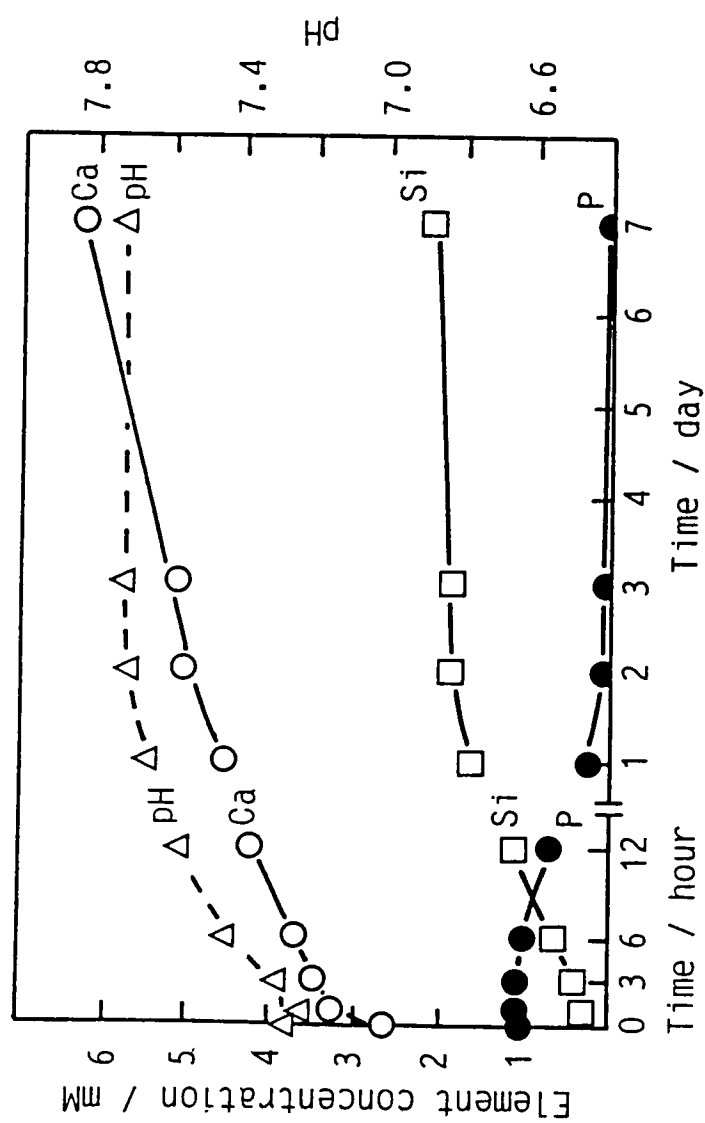


図7 Ca50Si45P5ガラスの浸漬による擬似体液の元素濃度及びpHの変化。

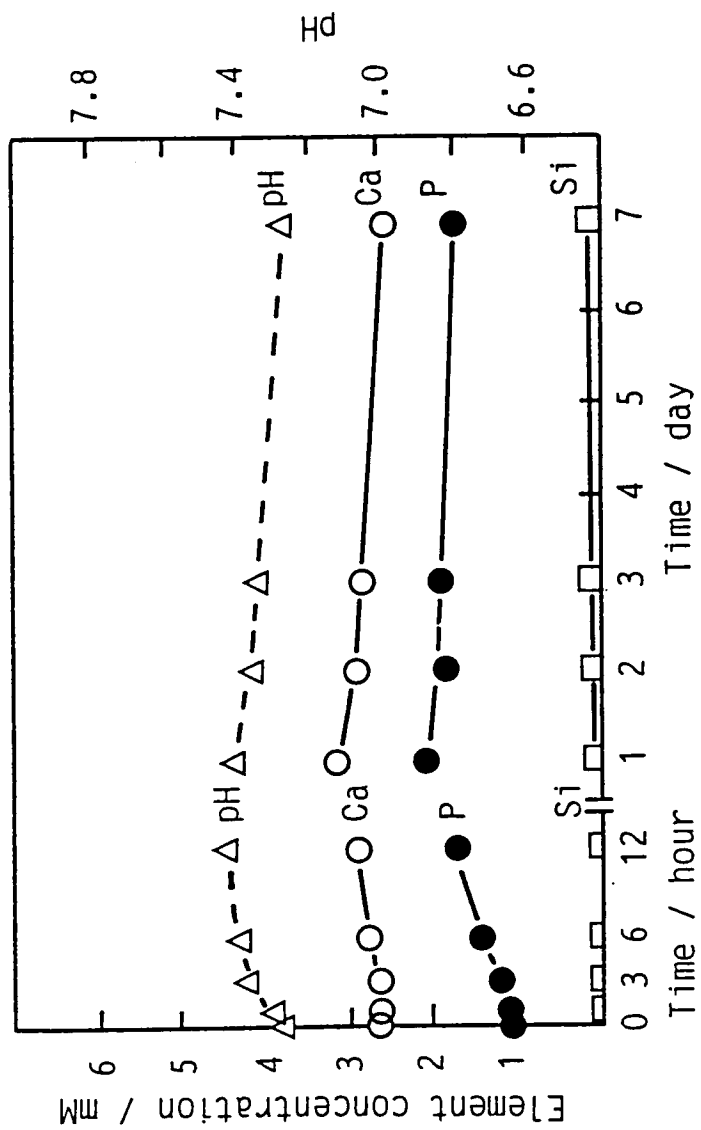


図8 Ca50Si5P45ガラスの浸漬による擬似体液の元素濃度及びpHの変化。

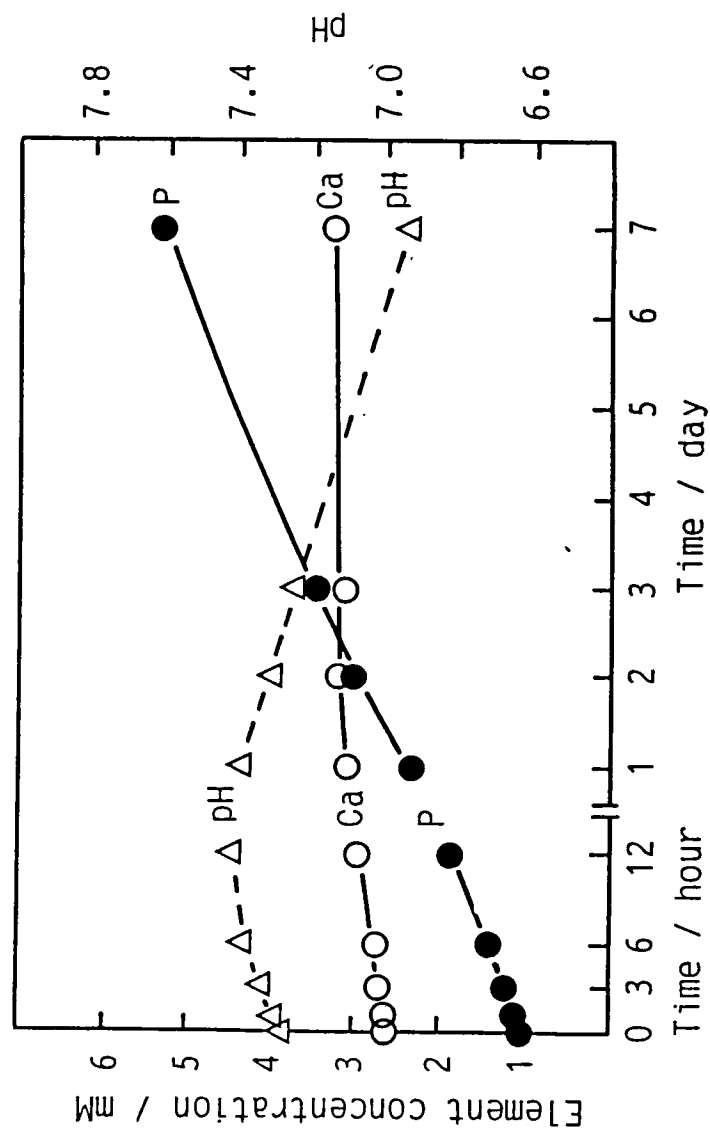


図9. Ca50P50ガラスの浸漬による擬似体液の元素濃度及びpHの変化。

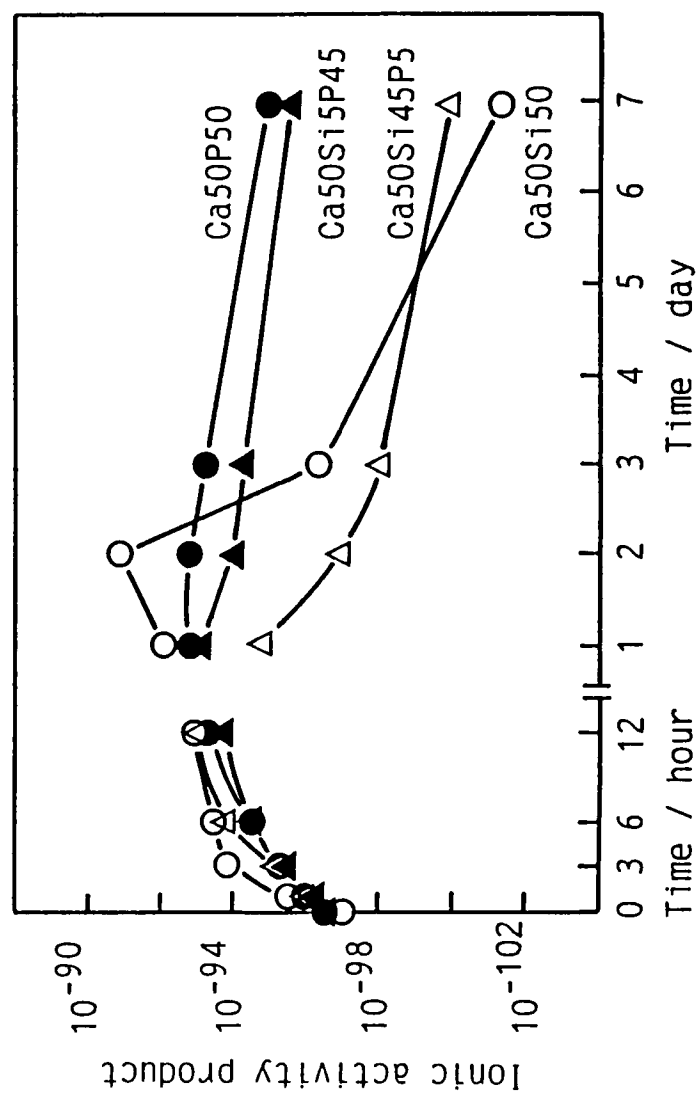


図10. Ca50Si50, Ca50Si45P5, Ca50Si5P45及びCa50P50ガラスの浸漬による擬似体液のアパタイトに対するイオン活動度積の変化。

総括

一般に、人工材料を骨の欠損部に埋入すると、生体はこれを線維性の被膜によって取り囲み、周囲の骨から隔離しようとする。しかし、無機固体物質の中には少数ながら、線維性被膜を全く作らずに、周囲の生きている骨と直接接し、それと強く結合するものがある。それらは生体活性物質と呼ばれる。1972年Henchらにより $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ 系のガラス (Bioglass) が発見されて以来、種々の組成と構造を有する無機固体物質が骨と結合することが明らかにされてきたが、これらの物質は無機固体物質の中のごく一部であり、大部分の無機固体物質は生体活性を示さない。何故特定の物質が生体活性を示し、他の物質が示さないかを明らかにすることは、生体活性物質の設計指針を得るためにも、また自然の骨の生体内における石灰化機構を知る上でも重要である。本研究は、これらの点を特に酸化カルシウムと二酸化ケイ素を主成分とする物質について基礎的に明らかとすることを目的として行ったものである。

従来上記のBioglass及びいくつかの無機質ガラス及び結晶化ガラスについて、それらは生体内でその表面に骨の無機質と同種のアパタイトの薄層を作成し、それを介して骨と結合することが報告されてきた。しかし、ドイツの研究者によって生体活性を示すことが見いだされた結晶化ガラスCeravital、すなわち $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ 系のガラス中にアパタイトを析出させた結晶化ガラスについては、透過電子顕微鏡観察に基づいて、全く異なった結合機構が報告されていた。著者は、この結合機構に疑問を持ち、同種類の結晶化ガラスを自分で合成し、これをヒトの体液に等しいイオン濃度を有する擬似体液に種々の期間浸漬し、その表面構造変化を薄膜X線回折、フーリエ変換赤外反射分光法及び走査電子顕微鏡観察により調べ、さらに同結晶化ガラスを兔の脛骨に埋入し、種々の期間経過後に同結晶化ガラスと骨の界面構造を電子線プローブX線マイクロアナリシスにより調べた。

その結果、同結晶化ガラスも他の無機質ガラス及び結晶化ガラスと同様に、生体内で先ずその表面に骨の無機質と同種のアパタイトの薄層を形成し、それを介して骨と結合することが明らかになった。これにより、無機質ガラス及び結晶化ガラスが骨と結合する条件は、それらが生体内でその表面に骨類似のアパタイト層を形成することであると結論された。

次いで、無機質ガラス及び結晶化ガラスが生体内でその表面に骨類似のアパタイト層を形成する条件を明らかにするために、組成が単純な $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 及び $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ それぞれの3成分系において、種々の組成のガラスを調製しそれらを種々の時間上記の擬似体液に浸漬し、その表面構造変化を薄膜X線回折、フーリエ変換赤外反射分光法及び走査電子顕微鏡観察により調べた。この擬似体液は、生体内のアパタイト層の形成をかなり良く再現できることをいくつかの無機質ガラス及び結晶化ガラスについて既に確かめられている。その結果、擬似体液中でガラス表面に骨類似のアパタイト層が形成されるのは、いずれの3成分系においても CaO と SiO_2 を主成分とする組成域に限られることが明らかとなった。 CaO と SiO_2 2成分だけから成るガラスでもアパタイト層を形成した。この結果から、無機質ガラス及び結晶化ガラスが生体内でその表面に骨類似のアパタイト層を形成する条件は、それらが酸化カルシウムと二酸化ケイ素を含むことであると結論された。

次に、生体内で無機質ガラス及び結晶化ガラス表面に骨類似のアパタイトが形成される際の、酸化カルシウム及び二酸化ケイ素の役割りを明らかにするために、 CaO と SiO_2 を主成分とするガラス2種及び CaO と P_2O_5 を主成分とするガラス2種を調製し、それらを上記擬似体液に浸漬し、その表面構造変化を薄膜X線回折とフーリエ変換赤外反射分光法により時間を追って詳しく追跡し、同時に擬似体液のイオン濃度変化を高周波誘導結合プラズマ発光分光法により時間を追って追跡した。その結果、 CaO と SiO_2 を主成分とするガラスは、擬似体液中で先ずカルシウム

イオンを溶出し、その結果その表面に水和ケイ酸ゲル層を作成し、次いでその上に骨類似のアパタイトの層を形成すること、一方CaOとP₂O₅を主成分とするガラスは、擬似体液中でカルシウムとリン酸イオンを一様に溶出して、その表面構造に目立った変化を示さないことが明らかになった。これらの結果から前者のガラスが擬似体液中でその表面にアパタイト層を形成し、後者のガラスがアパタイト層を形成しない原因は次のように説明できた。体液は通常の状態でもアパタイトの溶解度を越える量のカルシウムとリン酸イオンを含んでいる。従って体液中では、アパタイトは核さえ形成されればいつでも自然に成長し得る状態にある。それにも関わらず、CaOとP₂O₅を主成分とするガラス表面にはアパタイト層が形成されず、CaOとSiO₂を主成分とするガラス表面にアパタイト層が形成されるのは、前者のガラス表面でのアパタイト核形成速度がきわめて小さく、後者のガラス表面での核形成速度が大きいためである。一般に水溶液中における固体表面での核形成速度は、主に水溶液中に含まれる結晶成分の過飽和の程度、結晶と固体表面の間の界面エネルギーの大きさ、及び結晶構成成分が水溶液中から結晶中に移動するのに要するエネルギー障壁の高さによって決まる。この中、擬似体液中におけるガラス表面でのアパタイト核形成を考える限り、最後の因子はガラスの種類によらず一定である。しかし、初めの2つの因子はガラスの種類によって変わり得る。擬似体液のアパタイトに対する過飽和度はガラスからのイオンの溶出によって変化する。アパタイトに対する過飽和度は、アパタイトの溶解度積に対するイオン活動度積の比で与えられる。ガラスを擬似体液に浸漬したときの、イオン活動度積の変化を、擬似体液のイオン濃度変化から求めた結果、CaOとSiO₂を主成分とするガラスを擬似体液に浸漬した時のアパタイトに対する過飽和度の増加は、CaOとP₂O₅を主成分とするガラスを浸漬した時の過飽和度の増加にほぼ等しいことが分かった。それにも関わらず、CaOとSiO₂を主成分とするガラスの表面にだけアパタイト核が形成されるのは、このガラスの表面に形成される水和ケイ酸ゲルがアパタ

イトに対して特別に小さい界面エネルギーを与え、不均一核形成を誘起するためであると結論できる。

以上の結果から、酸化カルシウムと二酸化ケイ素を主成分とする無機固体物質が、生体活性を示す原因は次のように説明できる。この種の物質を生体内に埋入するとまずカルシウムイオンが溶出して周囲の体液のアパタイトに対する過飽和度を上昇させる。次いで、表面の二酸化ケイ素が水和してケイ酸イオンを形成し、これがアパタイトに対して低い界面エネルギーを示す表面を形成する。その結果、上記物質表面にアパタイトの不均一核生成が誘起される。いったんアパタイトの核が生成すると、周囲の体液はすでにアパタイトに対して過飽和な状態にあるので、アパタイト核は周囲の液からカルシウムとリン酸イオンを取り込んで自発的に成長し、アパタイト層を形成する。このアパタイト層は骨の無機質と同様、格子の乱れ多い炭酸イオン含有水酸アパタイトの微粒子から成っているため、このアパタイト層の上では、線維性皮膜を作る線維芽細胞より骨を作る骨芽細胞の方が増殖し易い。その結果、骨は線維性皮膜の介在なしに上記物質表面のアパタイト層と直接出会うことができる。両者が直接出会うと、表面のアパタイトと骨の中のアパタイトは、その間の界面エネルギーを下げるために強い化学結合を形成する。

かねてより、ラットの骨成長端にはシリコンが濃縮されていることが報告されている。またケイ素成分を絶った餌で飼育したヒヨコは十分な骨格構造の発達を示さないことが報告されている。これらの結果は、骨の石灰化においてもケイ素が重要な役割を果たしていることを示している。これらの結果は、アパタイトの核形成に水和ケイ酸イオンが重要な役割を果たしていることを示す本研究の結果と一致している。

,

謝 辞

本研究を進めるに際しては、京都大学化学研究所新機能材料研究部門教授 小久保 正氏に終始懇切丁寧な指導をして頂いた。新機能材料研究部門助教授 木山雅雄氏には、終始適切な助言を頂いた。この他、同研究部門の諸先生方、学生、受託研究員の方々からも始終多くの助言を頂いた。

これらの方々に深く感謝の意を表します。